



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 6258](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID%3A6258)

To cite this version :

Mereaux, Rémi. *Caractérisation de l'exposition foetale et maternelle au bisphénol A et au bisphénol A-glucuronide dans un modèle ovin fondé sur les considérations physiologiques*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2012, 77 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

CARACTERISATION DE L'EXPOSITION FOETALE ET MATERNELLE AU BISPHENOL A ET AU BISPHENOL A-GLUCURONIDE DANS UN MODELE OVIN FONDE SUR DES CONSIDERATIONS PHYSIOLOGIQUES

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2012
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

MEREAUX Rémi

Né, le 16 août 1987 à Dunkerque (59)

Directeur de thèse : Mme Nicole HAGEN

JURY

PRESIDENT :

M. Jean PARINAUD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEURS :

Mme Nicole HAGEN

Mme Véronique GAYRARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

Mme Catherine VIGUIE

M. Tanguy CORBEL

Docteur vétérinaire

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

NEGRE	M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES
	M. C. LABIE	M. JF. GUELF	M. DORCHIES
	M. C. PAVAU	M. ECKHOUTTE	
	M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
	M. A. RICO	M. CABANIE	
	M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
	Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
M. SAUTET Jean, *Anatomie*
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1°
CLASSE**

M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 2°
CLASSE**

Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*

M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
 M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
 M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
 Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
 M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
 Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
 M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
 M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
 M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
 M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
 M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
 Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
 M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
 M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
 Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
 Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
 M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
 Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
 M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
 M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*.
 Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)
--

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
 Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
 M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
 Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
 Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
 Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
 M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
 M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
 M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
 M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
 Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
 M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
 M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
 Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
 M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
 M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
 M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
 M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
 Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
 M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
 M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
 Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
 Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS
--

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
M. **DASTE Thomas**, *Urgences-soins intensifs*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Remerciements

Aux membres du jury de thèse,

A Monsieur le Professeur Jean PARINAUD

De l'Université Paul Sabatier,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.
Hommage respectueux.

A Madame le Professeur Nicole Hagen-Picard

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui m'a guidé tout au long de l'élaboration de ce travail.
Pour sa disponibilité et ses précieux conseils.
Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Véronique Gayrard-Troy

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui a aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse.
Sincère reconnaissance.

A Madame le docteur Catherine VIGUIE,

Docteur Vétérinaire.

Pour son aide et ses conseils tout au long de ce travail.
Sincère reconnaissance.

A Monsieur Tanguy CORBEL,

Pour son encadrement, sa pédagogie et ses précieux conseils tout au long de ce travail.
Sincère reconnaissance.

Dédicaces

A **mon père**,

merci de t'être investi pour mes études et pour ce que tu m'as transmis dans de nombreux domaines.

A **ma mère**,

pour tout ton soutien et car tu restes fière de moi.

A mes frères, **Jérôme et Pierre**,

aujourd'hui, chacun d'entre nous a trouvé sa voie, je vous souhaite beaucoup de joie et de réussite !

A **Michèle**,

pour m'avoir accompagné et soutenu dans ces études.

A **Edith et Tanguy**,

pour ces bons moments passés ensemble en clinique et en dehors, je vous souhaite beaucoup de bonheur.

A mes partenaires de trinôme en A5 bovine,

Nadia, pour sa bonne humeur permanente et son calme avec les animaux qui m'ont énervé depuis longtemps et **Lucie**, pour ses conseils avisés « d'interne » et sa gentillesse.

A **Magali et Charlotte**, avec qui j'ai passé vraiment de bons moments à l'ENVV et grâce à qui, j'étais au courant de beaucoup de potins ! à tous les autres de l'école véto **Hélène, Cécé, Marie, Sandrine, Vanessa, Laura, Cécile...** et d'ailleurs, qui étaient présents lors de ce parcours.

A **Margaux** (sans oublier Lou !),

..., et car tu es venue, pour moi, aujourd'hui.

Table des matières

Introduction.....	17
I. Etude bibliographique.....	19
<i>I.1. Le Bisphénol A : utilisation et données réglementaires</i>	<i>19</i>
I.1.1. Utilisation du Bisphénol A	19
I.1.2. Aspects réglementaires	20
I.1.3. Décisions politiques	21
<i>I.2. Contamination et exposition humaine au Bisphénol A</i>	<i>22</i>
I.2.1. Voies de contamination	22
I.2.2. Exposition au Bisphénol A	22
I.2.3. Exposition interne au Bisphénol A pendant la gestation	23
<i>I.3. Métabolisme du Bisphénol A : la gestation constitue-t-elle une période à risque ?</i>	<i>24</i>
I.3.1. Métabolisme du Bisphénol A	24
I.3.2. Impact des changements physiologiques liés à la gestation sur le métabolisme du Bisphénol A chez la mère	25
I.3.3. Métabolisme fœto-placentaire du Bisphénol A	26
<i>I.4. Effets du Bisphénol A et de son métabolite sur l'organisme</i>	<i>28</i>
I.4.1. Effets du Bisphénol A	28
I.4.2. Mode d'action du Bisphénol A	30
<i>I.5. Contexte de notre étude</i>	<i>31</i>
I.5.1. Choix du modèle ovin	31
I.5.2. Objectifs de l'étude	31
II. Matériels et méthodes	33
<i>II. 1. Plan expérimental.....</i>	<i>34</i>
<i>II.2. Animaux.....</i>	<i>37</i>
II.2.1. Conditions de vie	38
II.2.2. Prophylaxie sanitaire	38
II.2.3. Mise à la reproduction	38
II.2.4. Agnelages	39
<i>II.3. Préparation des solutions à administrer</i>	<i>39</i>
<i>II.4. Procédures expérimentales.....</i>	<i>40</i>
II.4.1. Mise en place chirurgicale des cathéters fœtaux et amniotiques	40
II.4.2. Modalités des administrations de BPA et de son métabolite	44
II.4.3. Modalités des prélèvements.....	46
II.4.4. Traitement des échantillons collectés	48
II.4.5. Dosages des échantillons	48
II.4.6. Dialyse à l'équilibre	48
<i>II.5. Analyse des données</i>	<i>49</i>
III. Résultats	53
<i>III.1. Effet de la gestation sur la toxicocinétique du Bisphénol A.....</i>	<i>53</i>
III.1.1. Paramètres toxicocinétiques du Bisphénol A	53
III.1.2. Paramètres toxicocinétiques du BPA-glucuronide aux périodes 3 et 4 (modèle non compartimental : option sparse data)	54

III.1.3. Effet de la gestation sur la fraction de Bisphénol A libre.....	55
<i>III.2. Toxicocinétique et métabolisme du BPA et du BPA-glucuronide chez le fœtus à 4 mois d'âge</i>	
<i>conceptionnel</i>	56
III.2.1. Toxicocinétique du Bisphénol A chez le fœtus	56
III.2.2. Disposition du Bisphénol A et de ses métabolites dans l'unité fœto-maternelle après une administration fœtale de Bisphénol A-glucuronide.....	57
III.2.3. Fraction de Bisphénol A libre chez le fœtus à 4 mois d'âge gestationnel	58
III.2.4. Disposition du Bisphénol A et de ses métabolites dans les compartiments materno-fœtal après une administration maternelle de Bisphénol A	59
III.2.5. Disposition du Bisphénol A et de ses métabolites dans l'unité fœto-maternelle après une administration maternelle de Bisphénol A-glucuronide.....	60
III.2.6. Clairances non placentaires maternelle et fœtale et des clairances placentaires materno-fœtale et fœto-maternelle.....	61
IV. Discussion	63
Conclusion	69
Bibliographie.....	73
Annexe	77

Liste des illustrations

Liste des figures

- Figure 1. Utilisation du BPA comme composant des polycarbonates et des résines epoxy (d'après bpa-europe.org).
- Figure 2. Réaction de glucuronoconjugaison du BPA.
- Figure 3. Métabolisme du BPA chez le fœtus du rat (d'après Nishikawa *et al*, 2010).
- Figure 4. Structure chimique du Bisphénol A (à gauche) et de l'œstradiol (à droite).
- Figure 5. Organisation temporelle des différentes étapes de l'étude longitudinale.
- Figure 6. Cathéter jugulaire fixé dans la veine jugulaire.
- Figure 7. Cathéters amniotique, carotidien et jugulaire extériorisés après sutures des plans musculaires.
- Figure 8. Brebis munie du dispositif de perfusion.
- Figure 9: Modèle toxicocinétique bicompartimental ouvert, avec un compartiment maternel et fœtal, permettant de décrire les clairances maternelle et fœtale, placentaire et non placentaire. Le BPA est éliminé à la fois du compartiment maternel et du compartiment fœtal.
- Figure 10. Concentrations plasmatiques de BPA et de ses métabolites pour quatre stades physiologiques différents (A - n=6 : 1 mois avant la gestation, B – n=6 : 1 mois de gestation, C – n=8 : 4 mois de gestation et D – n=4: 1 mois après la mise-bas) pendant et après une perfusion IV de BPA à la dose de 2mg/kg/jour pendant 24 h. la flèche noire indique la fin de la perfusion.
- Figure 11. Pourcentage de BPA libre dans le plasma maternel à l'état d'équilibre (moyenne±ET) aux quatre stades physiologiques après une perfusion IV de BPA à la dose de 2 mg/kg/jour pendant 24 heures.
- Figure 12. Concentrations de BPA et de ses métabolites chez un couple mère-fœtus représentatif après une perfusion IV de BPA chez le fœtus à la dose de 5 mg/kg/jour pendant 24 heures.
- Figure 13. Concentrations plasmatiques de BPA-glucuronide chez un fœtus représentatif après une perfusion IV de BPA-glucuronide à la dose de 3.54 mg/kg/jour pendant 24 heures.
- Figure 14. Concentrations du BPA et de ses métabolites chez un couple mère-fœtus après une perfusion IV de BPA chez la mère à la dose de 2 mg/kg/jour pendant 24 heures.
- Figure 15. Concentrations des métabolites du BPA dans chacun des compartiments du complexe fœto-maternel après une perfusion IV de BPA-glucuronide chez la mère à la dose de 3.54 mg/kg/jour pendant 24 heures.
- Figure 16. Description des clairances maternelle, fœtale et placentaires à chez la brebis à 4 mois de gestation.

Liste des tableaux

- Tableau 1. Concentrations de BPA dans chacun des compartiments fœto-maternels, au cours de la grossesse et au moment de l'accouchement chez la femme.

Tableau 2. Organisation du plan en cross-over de la période 3.

Tableau 3. Organisation du plan en cross-over de la période 4.

Tableau 4. Moyenne des poids à la naissance des agneaux en fonction du nombre de fœtus dans la portée et du sexe.

Tableau 5. Caractéristiques des cathéters fœtaux et amniotiques.

Tableau 6. Paramètres toxicocinétiques moyens du BPA (\pm écart-type, ET) pour quatre stades physiologiques différents après une perfusion IV de BPA à la dose de 2 mg/kg/jour pendant 24h.

Tableau 7. Paramètres toxicocinétiques moyens aux périodes 3 et 4 après une perfusion IV de BPA-glucuronide à la dose de 3.54 mg/kg/jour pendant 24h.

Tableau 8. Concentrations moyennes de BPA et de ses métabolites dans le plasma maternel et foetal et dans le liquide amniotique à l'état d'équilibre après une perfusion IV au fœtus de BPA à la dose de 5 mg/kg/jour pendant 24 heures.

Liste des acronymes et abréviations

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Aliments, de l'Environnement et du Travail
AUC : Area Under Curve – Aire sous la courbe
BPA : Bisphénol A
BPA-glucuronide : Bisphénol A-glucuronide
BPA-sulfate : Bisphénol A-sulfate
Ci : Curie
DES : Diéthylstilbestrol
DJA : Dose Journalière Admissible
dpm : désintégration par minute
EC : écart-type
EC50 : Concentration plasmatique d'une substance induisant 50% de son effet maximal
EFSA : European Food Safety Authority – Agence européenne de sécurité des aliments
EPA : Environmental Protection Agency (Etats-Unis) – Agence américaine de protection de l'environnement
ER : Estrogen receptor - Récepteur aux œstrogènes
FAI: Free Androgens Index – Concentration en androgènes non liés à la SHBG
FDA: Food and Drug Administration – Agence fédérale américaine des denrées alimentaires et des médicaments
FSH: Follicle Stimulating Hormone – Hormone Folliculo-Stimulante
HPLC-UV/SM : Chromatographie en phase liquide à haute performance, couplée à une détection par rayons ultra-violets/ spectrométrie de masse
IA: Insémination Artificielle
IM: Intramusculaire
IV : Intraveineuse
LH : Luteinizing Hormone – Hormone Lutéinisante
LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level (plus faible dose testée ayant des effets délétères sur l'organisme)
LOQ : Limit of quantification - Limite de quantification
P 1 à 4 : Période 1 à 4
PAG : Protéines Associées à la Gestation
PMSG : Gonadotrophine extraite du sérum de jument gravide - Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
Pr : Prélèvement de sang maternel – Prf : prélèvement de sang fœtal
REACH : enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques
SC : Sous-cutané
SHBG: Sex Hormone Binding Globulin – globuline liant les hormones sexuelles
UDP : Uridine diphosphate
UE : Union Européenne
UGT : Uridine diphosphate-glucuronyl-transférase
UPLC/MS : Ultra performance liquid chromatography/ Mass spectrometry – chromatographie en phase liquide ultra performante couplée à une détection par spectrométrie de masse
VO : Voie Orale

Introduction

Depuis les années 1980s, de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une augmentation des troubles de la reproduction chez l'homme. En effet, une baisse de la fertilité, une augmentation de l'incidence de pathologies liées aux hormones sexuelles (cancer de la prostate, du sein) et des cas de puberté précoce ont été observés dans la population humaine des pays occidentaux ces dernières décennies (*Carlsen et al, 1992 ; Fernandez et al, 2010 ; Howdeshell et al, 1999*). Ces études suggèrent l'existence d'un lien entre l'exposition à des substances chimiques présentes dans l'environnement et l'augmentation de l'incidence de ces troubles.

Les substances chimiques, capables de provoquer des désordres endocriniens, ont été regroupées sous le terme de perturbateur endocrinien. D'après l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA), un perturbateur endocrinien est « un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme ». Parmi ces composés figure le Bisphénol A (BPA), un xénobiotique utilisé comme monomère dans les plastiques de type polycarbonate et les résines epoxy. Cette substance a été fortement médiatisée ces dernières années car elle rentre dans la composition des biberons en plastique de type polycarbonate. Le potentiel perturbateur endocrinien du BPA a été reconnu depuis la conférence de Chapel Hill (Etats-Unis, 2006) lors de laquelle un lien possible a été établi entre les troubles de la reproduction et l'exposition au BPA (*Vom Saal et al, 2007*).

Un récent rapport établi par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Aliments, de l'Environnement et du Travail (ANSES) a suggéré de limiter l'exposition des femmes enceintes au BPA (*ANSES, 2011*). En effet, la grossesse constitue une période pendant laquelle l'exposition maternelle au BPA pourrait présenter un risque pour la mère et le fœtus. Il apparaît donc nécessaire de développer des modèles animaux pertinents permettant de documenter l'exposition interne fœtale au BPA pendant la gestation afin de pouvoir évaluer le risque pour la santé humaine lié à l'exposition environnementale au BPA pendant la grossesse.

Ainsi, l'objet du présent travail est de caractériser l'exposition interne maternelle et fœtale au BPA et à ses métabolites dans le modèle de la brebis gravide.

Les objectifs sont :

- d'évaluer l'effet de la gestation sur la pharmacocinétique du BPA et de son principal métabolite (le BPA-glucuronide) chez la brebis
- d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques du BPA et de son métabolite chez le fœtus ovin à 4 mois d'âge conceptionnel
- d'évaluer les passages transplacentaires materno-fœtal et fœto-maternel de ces deux composés à 4 mois d'âge gestationnel.

La première partie de ce manuscrit est une synthèse bibliographique, qui fait état des connaissances actuelles sur le BPA et notamment sur le risque lié à une exposition au BPA pendant la gestation. La deuxième partie présente notre étude expérimentale selon un plan classique, matériels et méthodes, résultats et discussion.

I. Etude bibliographique

I.1. Le Bisphénol A : utilisation et données réglementaires

I.1.1. Utilisation du Bisphénol A

Le Bisphénol A [BPA, (2,2bis (4-hydroxydiphényl)propane), $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$] est un xénobiotique, c'est-à-dire un composé chimique non synthétisé par les organismes vivants. Il est utilisé pour la fabrication industrielle des plastiques de type polycarbonate et des résines époxy.

Le BPA a été synthétisé pour la première fois en 1891 par le chimiste russe A. Dianin, à partir de la condensation d'un équivalent acétone avec deux équivalents phénols (*Adamo et al, 2010*). Dans les années 1950s, les Drs. H. Schnell (Bayer, Allemagne) et D. Fox (General Electric, Etats-Unis) développèrent le plastique de type polycarbonate, ayant pour monomère le BPA. La commercialisation de ce composé débuta aux Etats-Unis quelques années plus tard (*site bpa.org*).

La fabrication des plastiques de type polycarbonate représente aujourd'hui 70% de l'utilisation du BPA. Ce type de matériel, grâce à ses nombreuses qualités : transparence, résistance aux chocs et à la chaleur, souplesse..., trouve de nombreuses applications, notamment la fabrication de biberons, (figure 1) (*site bpa europe*).

Les résines epoxy constituent 30% de l'utilisation du BPA. Elles sont utilisées en tant que colle ou revêtements divers dans de nombreux domaines, dans les revêtements intérieurs des boîtes de conserve ou comme ciment dentaire notamment (figure 1). Sur ces types de produits, ces résines jouent le rôle d'un film protecteur, rigide, résistant à la corrosion et stable (*site bpa-europe*).

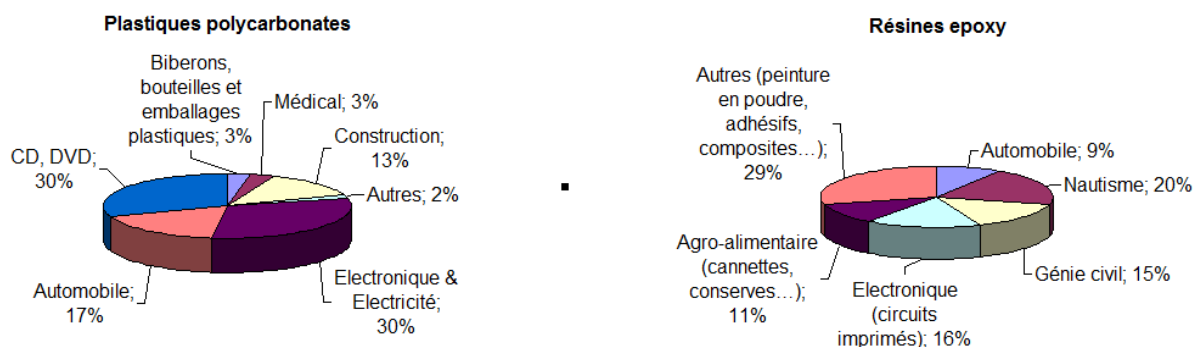


Figure 1. Utilisation du BPA comme composant des polycarbonates et des résines epoxy (d'après bpa-europe.org).

Ainsi, aujourd'hui, environ 3.8 millions de tonnes de BPA sont produites chaque année dont 1 million de tonnes aux Etats-Unis. Au niveau mondial, l'utilisation par différentes firmes du BPA engendre chaque jour un revenu de 1 million de dollars (Erler et al, 2010). Au niveau européen, 550 000 emplois dépendent directement ou indirectement de cette industrie (site bpa-europe).

I.1.2. Aspects réglementaires

Toute substance fabriquée ou importée à raison de plus de 10 tonnes par an doit faire l'objet d'un rapport sur la sécurité chimique afin de démontrer son absence de nocivité pour l'homme et l'environnement (directive européenne REACH : enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques). Suite à des études d'exposition chronique au BPA menées sur plusieurs générations de rats (Tyl et al, 2002), la LOAEL (plus faible dose testée ayant des effets délétères sur l'organisme) a été estimée à 5 mg/kg/jour. L'EPA et l'Autorité Européenne de Sécurité des aliments (EFSA) ont ensuite déterminé une dose journalière acceptable (DJA) pour le BPA en prenant un facteur de sécurité de 100 ($DJA = LOAEL/100$), soit 50 µg/kg/jour. Cette valeur représente la dose de BPA pouvant être ingérée par l'homme chaque jour, durant toute sa vie, sans danger. Cependant, en 1997, Nagel et al ont mis en évidence une augmentation du poids de la prostate chez les portées de souris dont la mère recevait, par voie orale, 2 ou 20 µg/kg/j de BPA pendant la gestation (Nagel et al, 1997). De nombreuses autres études ont observé un effet du BPA à de faibles doses, c'est-à-dire à des doses inférieures à la DJA. Des effets délétères comme des perturbations de la croissance, des anomalies dans le développement de la fonction sexuelle ou du cerveau, des dysfonctionnements de la fonction immunitaire et des modifications comportementales ont en

effet été montrés chez de nombreuses espèces animales (invertébrés et vertébrés incluant les mammifères) (*Vom Saal et al, 2005*) pour des niveaux d'exposition inférieurs à la DJA pendant la gestation, en période périnatale ou chez l'adulte (*Vom Saal et al, 2005*). Ainsi, en décembre 2004, Vom Saal et al ont référencé sur PubMed 115 études évaluant les effets du BPA à de faibles doses : 94 rapportent des effets significatifs pour des doses inférieures à la LOAEL, dont 31 montrant un effet significatif du BPA à des doses inférieures à la DJA (*Vom Saal et al, 2005*).

En dépit de ces données, en 2008, l'EFSA a tout de même maintenu la DJA à 50 µg/kg/jour dans l'Union Européenne (UE). Elle a estimé que les effets à faibles doses observés chez les rongeurs ne sont pas extrapolables à l'homme, en raison notamment de différences toxicocinétiques interspécifiques.

1.1.3. Décisions politiques

La polémique sur les éventuels effets du BPA à faibles doses a conduit les politiques à prendre des mesures variables d'un Etat à l'autre. Au Canada, le gouvernement a décidé, en mars 2010, d'interdire l'importation, la vente et la publicité de biberons en polycarbonate. Il a essayé également de développer un code de conduite visant à réduire au maximum la quantité de BPA dans les laits en poudre. Dans l'UE, l'emploi du BPA est autorisé dans les matériaux en contact avec les aliments, conformément à la directive 2002/72/CE de la Commission Européenne du 6 août 2002 (*d'après bpa-europe.org*). En France, la loi 2010-729 de juin 2010 a suspendu la fabrication et la commercialisation de biberons en polycarbonate. Récemment, en octobre 2011, l'Assemblée Nationale a adopté une proposition de loi visant à interdire l'utilisation du BPA dans les contenants alimentaires, avec prise d'effet au 1^{er} janvier 2014. Le vote de ce texte intervient après la publication d'un rapport de l'ANSES, selon lequel il était recommandé de limiter l'exposition des femmes enceintes et des enfants au BPA (*ANSES, 2011*).

I.2. Contamination et exposition humaine au Bisphénol A

I.2.1. Voies de contamination

La contamination humaine est principalement d'origine alimentaire. Le BPA est en effet retrouvé dans les aliments conditionnés dans des contenants en plastiques de type polycarbonate ou à base de résine epoxy. Les monomères de BPA, libéré par hydrolyse du pont ester liant les monomères dans le polycarbonate ou l'epoxy, se retrouve alors dans la nourriture (*Vom Saal et al, 2005*). La chaleur ou des modifications acido-basiques amplifient ce phénomène. Ainsi, le stockage des aliments dans des boîtes de conserve, leur stérilisation ou bien le chauffage des biberons entraînent une libération de monomères de BPA et augmente la contamination alimentaire.

Le BPA peut aussi traverser la barrière cutanée chez l'homme, 46% du BPA placé dans un milieu de culture est absorbé par des échantillons de peau humaine. Cette voie représente toutefois une voie de contamination minoritaire (*Zalko et al, 2011*) sauf éventuellement pour des personnes particulièrement exposées (caissières de supermarché qui manipulent les tickets de caisse en papier thermosensible contenant du BPA). Il est à noter, cependant, que très peu d'études ont évalué les autres voies de pénétration du BPA dans l'organisme humain (par l'air, la poussière...) (*Vandenberg et al, 2007*).

I.2.2. Exposition au Bisphénol A

La large utilisation du BPA explique qu'il est retrouvé partout dans l'environnement. Une étude américaine a, en effet, évalué sa concentration dans l'eau des rivières à 8 ng/mL. Il est aussi retrouvé dans l'air (<0.0001%) et dans le sol (*Kang et al, 2006*). L'environnement est donc une source d'exposition au BPA pour les espèces animales et pour l'homme.

Une estimation de l'exposition totale au BPA basée sur l'analyse des valeurs de migration de BPA depuis les sources d'exposition identifiées (aliment, air, eau, poussière) et en fonction des comportement de consommation a permis d'estimer l'exposition humaine à environ 1 µg/kg/jour (*EFSA, 2007*).

Afin de documenter la contamination humaine, de nombreuses études ont mesuré les concentrations de BPA des différents fluides corporels. Le BPA a ainsi été retrouvé dans le sérum à des concentrations variant de 0.2 à 20 ng/mL. Ces mesures ont été réalisées chez des hommes et des femmes, d'origines, d'âges et de modes de vie différents (*Vandenberg et al,*

2007). De même, Calafat et al ont détecté du BPA dans 95 % des échantillons urinaires d'une population de référence (échantillon de 394 adultes américains) à des concentrations supérieures à 0.1 ng/mL (Calafat et al, 2005). Le BPA a aussi été retrouvé dans le lait maternel, le placenta et le liquide amniotique (Vandenberg et al, 2007).

I.2.3. Exposition interne au Bisphénol A pendant la gestation

Le récent rapport de l'ANSES (ANSES, 2011) suggère que la gestation représente, chez l'homme, la période où l'exposition au BPA pourrait présenter un danger. Les études de biosurveillance ont permis d'évaluer les concentrations en BPA dans les différents compartiments fœto-maternels, à savoir le sang maternel, le placenta, le liquide amniotique et le sang fœtal (tableau 1).

Tableau 1. Concentrations de BPA dans chacun des compartiments fœto-maternels, au cours de la grossesse et au moment de l'accouchement chez la femme.

		Nombre échantillons	Moyenne concentrations plasmatiques BPA \pm écart-type ng/mL	Sources
Sang maternel	<i>non gravide</i>	14	0.64 \pm 0.1	Takeuchi et al, 2002
Sang maternel	<i>non gravide</i>	30	2 \pm 0.8	Ikezuki et al, 2002
	<i>début grossesse</i>	37	1.5 \pm 1.2	
	<i>fin grossesse</i>	37	1.4 \pm 0.9	
Liquide amniotique	<i>début grossesse</i>	32	8.3 \pm 8.7	
	<i>fin grossesse</i>	38	1.5 \pm 0.7	
Sang fœtal		32	2.2 \pm 1.8	
Sang maternel	<i>fin grossesse</i>	40	5.9 \pm 0.94	Padmanabhan et al, 2008
Sang maternel	<i>fin grossesse</i>	37	4.4 \pm 3.9 [mini : 0.3, maxi : 18.9]	Schönfelder et al, 2002
Sang fœtal			2.9 \pm 2.5 [mini : 0.2, maxi : 9.2]	
Placenta			11.2 \pm 9.1 ng/g [mini : 1, maxi : 104.9]	
Sang maternel	<i>fin grossesse</i>	300	9.4 \pm 14.3 [mini : non déterminé, maxi : 66.48]	Lee et al, 2008
Sang fœtal			1.13 \pm 1.43 [mini : non déterminé, maxi : 8.86]	

La comparaison de l'étude de Takeuchi et al avec celles de Lee et al, Padmanabhan et al et Schönfelder et al et suggèrent que les concentrations plasmatiques en BPA sont plus élevées chez la femme enceinte. Dans ces études, les concentrations plasmatiques en BPA chez la femme enceinte atteignent des valeurs élevées, jusqu'à 66.5 ng/mL (Lee et al, 2008), 22.3 ng/mL (Padmanabhan et al, 2008) et 18.9 ng/mL (Schönfelder et al, 2002). Le BPA est également mis en évidence dans les différents compartiments fœto-maternels pendant la grossesse, notamment à des concentrations importantes dans le liquide amniotique en début de gestation (Ikezuki et al, 2002). Les concentrations dans le sang fœtal sont du même ordre de grandeur que

les concentrations dans le sang maternel. Ces données montrent que le BPA est capable de passer à travers la barrière placentaire, de la mère au fœtus.

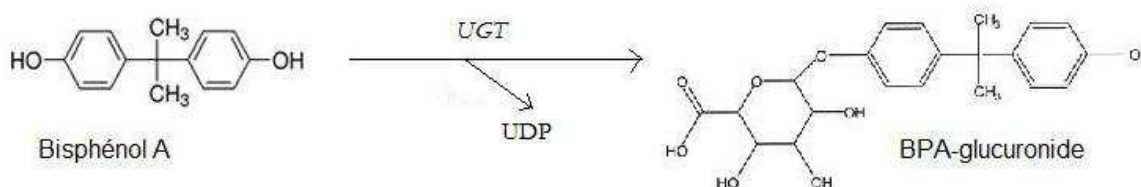
I.3. Métabolisme du Bisphénol A : la gestation constitue-t-elle une période à risque ?

Pour le fœtus, la gestation correspond à une période critique de développement caractérisée par des modifications physiologiques et toxicocinétiques importantes. Pour la mère, cette période est associée à de nombreux changements endocriniens et physiologiques. La gestation pourrait donc modifier le métabolisme du BPA et ainsi l'exposition interne maternelle au BPA.

I.3.1. Métabolisme du Bisphénol A

Le métabolisme du BPA, chez les mammifères, met en jeu des réactions enzymatiques de conjugaison. La glucuronoconjugaison qui a lieu dans le foie (figure 2), est catalysée par une uridine diphosphate-glucuronyl-transférase (UGT) et aboutit à la formation de BPA-glucuronide (*Kang et al, 2006*). D'autre part, la sulfoconjugaison, catalysée par une sulfotransférase, conduit à la formation de BPA-sulfate (*Pottenger et al, 2000*). La glucuronoconjugaison du BPA reste cependant la voie de métabolisation principale : l'analyse d'urines collectées chez une population de référence d'hommes adultes a montré que 69.5% du BPA total urinaire était sous forme de BPA-glucuronide et 21% sous forme de BPA-sulfate (*Ye et al, 2005*).

Le métabolisme du BPA représente un moyen de détoxification de l'organisme car ces métabolites ne se lient pas aux récepteurs aux œstrogènes (*Matthews et al, 2001*).



La glucuronoconjugaison du BPA est catalysée par des UDP-glucuronyl-transférases (UGT) qui favorisent la fixation de l'acide glucuronique sur un atome d'oxygène d'une des fonctions hydroxyle du BPA. Le résultat est la formation de BPA-glucuronide et d'Uridine-5'-diphosphate (UDP).

Figure 2. Réaction de glucuronoconjugaison du BPA.

Ainsi, chez l'homme, après une exposition environnementale au BPA, la part de BPA non conjugué dans le sang est faible : de 92 à 99% du BPA est sous forme de glucuronide (*ANSES, 2011*). Le BPA-glucuronide est ensuite rapidement (temps de demi-vie inférieur à 6h) éliminé par voie urinaire. La clairance urinaire apparente du BPA-glucuronide est de 0.13 L/min, soit 2.2 mL/kg/min, ce qui est équivalent à la clairance de la créatinine (*Völkel et al, 2002*). En revanche, chez le rat, le BPA-glucuronide est excrété dans l'intestin, via la bile, puis éliminé par voie fécale (il existe également une élimination urinaire du BPA-glucuronide chez le rat). Cependant, le BPA-glucuronide peut être hydrolysé en BPA au niveau du tube digestif, par des glucuronidases, capables de cliver les liaisons esters d'une partie des molécules de BPA-glucuronide. Ainsi, le BPA est libéré dans l'intestin et rejoint la circulation générale sous forme non conjuguée. La part de BPA non conjugué dans le sang est donc plus importante chez le rat que chez l'homme. Ce cycle entérohépatique explique l'élimination plus lente du BPA chez le rat (*Aguilar et al, 2008*).

Dans la circulation sanguine, le BPA non conjugué est transporté par des protéines plasmatiques, la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) et l'albumine. Le pourcentage de BPA libre est de l'ordre de 5% (*Csanady et al, 2002*). Chez l'homme, le BPA est lié à la SHBG avec une constante d'association 9000 fois inférieure à celle de l'œstradiol (*Déchaud et al, 1999*). Seul le BPA libre peut avoir un effet sur les tissus cibles.

1.3.2. Impact des changements physiologiques liés à la gestation sur le métabolisme du Bisphénol A chez la mère

Les changements physiologiques liés à la gestation pourraient-ils conduire à une augmentation des concentrations plasmatiques de BPA chez la mère ?

La gestation est associée à une modification de l'activité des enzymes glucuronotransférase, sulfotransférase et glucuronidase (*Domoradzki et al, 2003*). Chez la rate gravide, la glucurononconjugaison du BPA est réduite (*Matsumoto et al, 2002*) par rapport à celle observée chez la rate non gravide (résultat obtenu in vitro sur des hépatocytes). Cette baisse d'activité de l'UGT est à l'origine d'une modification de l'exposition interne au BPA, avec notamment une augmentation de la part de BPA non conjugué dans le sang.

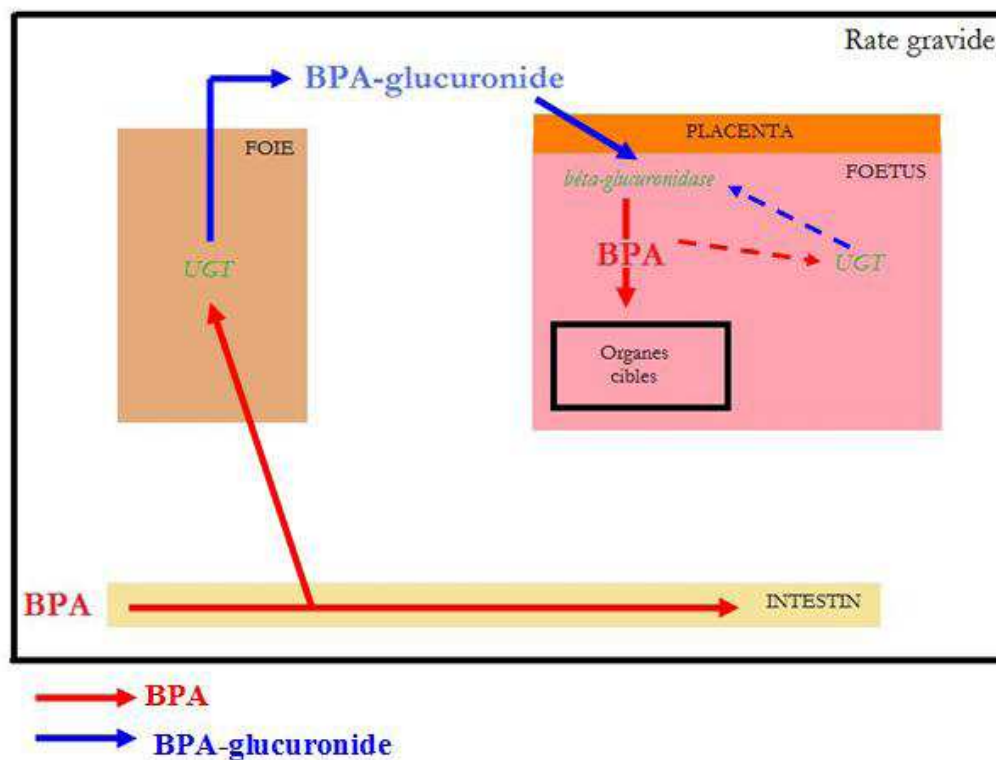
Des associations entre les niveaux hormonaux et l'exposition interne au BPA ont été observées dans différentes études. Galloway et al ont par exemple montré une corrélation positive entre les concentrations urinaires de BPA et les concentrations plasmatiques de

testostérone chez l'homme (*Galloway et al, 2010*). Mendiola et al ont relevé une corrélation négative entre les concentrations urinaires de BPA et la concentration en androgènes non liés à la SHBG (FAI), les ratios FAI/LH et testostérone libre/LH (*Mendiola et al, 2010*). Ces études suggèrent que les changements endocriniens liés à la gestation pourraient modifier l'exposition interne au BPA chez la mère, ou inversement que l'exposition interne au BPA pendant la gestation pourrait modifier l'environnement hormonal associé à la gestation. Par ailleurs, chez la femme, la concentration en SHBG augmente d'un facteur 10 pendant la grossesse (*Uriel et al, 1981*). Toutefois, la constante d'association du BPA à cette protéine étant faible, il semble peu probable que cette augmentation de la concentration en SHBG soit suffisante pour modifier la quantité de BPA non liée aux protéines plasmatiques, c'est-à-dire potentiellement soumise au processus d'élimination. Ce mécanisme pourrait cependant expliquer, en partie, une augmentation de l'exposition interne au BPA pendant la grossesse.

1.3.3. Métabolisme fœto-placentaire du Bisphénol A

Les données de biosurveillance montrent que du BPA est retrouvé dans le placenta, le sang fœtal et le liquide amniotique. L'origine du BPA retrouvé chez le fœtus est maternelle. En effet, le BPA, administré par voie orale à des souris gravides, est rapidement retrouvé dans les fœtus : 40 minutes après l'administration, les concentrations fœtales en BPA sont supérieures aux concentrations plasmatiques maternelles (*Takahashi et al, 2000*). Cette étude montre qu'il y a effectivement passage de BPA de la mère au fœtus par voie placentaire.

Dans le sang maternel, le BPA est majoritairement sous forme conjuguée. Nishikawa et al ont montré que le BPA-glucuronide était capable de passer la barrière placentaire : après une perfusion utérine de BPA-glucuronide chez la rate, 0.13% de la dose de BPA-glucuronide administrée à la mère se retrouve dans le conceptus et le liquide amniotique, dont 4.6% sous forme de BPA non conjugué chez le fœtus (figure 3, *Nishikawa et al, 2010*). Cette étude montre que, chez le rat, seule une faible partie du BPA-glucuronide maternel peut atteindre le fœtus. Elle suggère que l'unité fœto-placentaire pourrait être capable de déconjuguer le BPA-glucuronide grâce notamment à des β -glucuronidases hépatiques.



Chez la rate gravide, le BPA ingéré par voie orale, est transformé en BPA-glucuronide dans le foie (réaction catalysée par une enzyme de type UGT). Une faible partie du BPA-glucuronide (0.13%) passe la barrière placentaire et rejoint la circulation fœtale. L'unité fœto-placentaire est capable de déconjuguer le BPA-glucuronide via des β -glucuronidases. Le BPA déconjugué peut ensuite interagir avec les tissus cibles fœtaux.

Figure 3. Métabolisme du BPA chez le fœtus du rat (d'après Nishikawa et al, 2010).

La déconjugaison du BPA-glucuronide peut également avoir lieu dans le placenta. Collier et al ont mis en évidence une activité β -glucuronidase dans le placenta de rongeur à 18 jours de gestation (Collier et al, 2009).

Toutefois, pendant la gestation, l'activité des enzymes UGT est inexistante puis très faible juste avant la naissance chez les fœtus de rat (Matsumoto et al, 2002). Le fœtus de rongeur ne serait donc pas capable de transformer le BPA en BPA-glucuronide. Le BPA fœtal pourrait alors avoir un impact sur l'organisme fœtal. A la naissance, l'activité UGT augmente ensuite de manière linéaire pour atteindre le niveau de celle de l'adulte 21 jours après la naissance chez le rat (Matsumoto et al, 2002). Chez le fœtus ovin, à 120 jours d'âge conceptionnel, les gènes codant pour les UGT sont exprimés mais de façon significativement moins importante qu'à la naissance. A la naissance, ils sont significativement moins exprimés qu'à l'âge adulte (Pretheeban et al, 2011).

En définitive, le passage transplacentaire du BPA et de manière plus limitée de ses métabolites, associé à la faible capacité de conjugaison du BPA du fœtus, notamment en début de gestation, et aux activités de déconjugaison hépatique fœtale ou placentaire suggèrent un risque lié à l'exposition fœtale au BPA et pourrait expliquer les effets néfastes d'une exposition maternelle au BPA sur la progéniture (*Cabaton et al, 2011, Honma et al, 2002, Muñoz de Toro et al, 2005*).

I.4. Effets du Bisphénol A et de son métabolite sur l'organisme

I.4.1. Effets du Bisphénol A

De nombreuses études ont mis en évidence, chez le rat et la souris, des effets d'une exposition au BPA, notamment sur la fonction de la reproduction. Une baisse de la fertilité et de la fécondité a été observée chez des rates dont la mère a été exposée au BPA à la dose de 25 µg/kg/jour pendant la gestation (à partir du 8^{ème} jour) et la lactation (jusqu'au 16^{ème} jour) (*Cabaton et al, 2011*). De même, sur le modèle rongeur, une exposition in utero à la dose de 20 µg/kg/jour pendant 7 jours a entraîné un avancement de la puberté (*Honma et al, 2002*). L'exposition in utero à la dose de 25 ng/kg/jour pendant 14 jours chez la souris a provoqué une altération de la morphologie et du développement de la glande mammaire, ce qui pourrait constituer un facteur prédisposant de cancer (*Muñoz de Toro et al, 2005*). Chez le rat, le BPA (administré à la dose de 0.2 µg/kg/jour pendant 45 jours) a entraîné une diminution du nombre et de la motilité des spermatozoïdes épидидymaires (*Chitra et al, 2002*) et l'exposition néonatale (3 injections sous-cutanées à 10 µg/kg aux jours 1, 3 et 5 après la naissance) à ce xénobiotique favorise l'apparition du cancer de la prostate chez l'animal plus âgé (*Ho et al, 2006*). Des effets du BPA ont aussi été rapportés sur le métabolisme chez les rongeurs : une exposition périnatale (0.1 mg/kg/jour dès le 6^{ème} jour de gestation et pendant la lactation) peut perturber la régulation du poids corporel en modifiant la différenciation des adipocytes et la régulation de glycémie (*Rubin et al, 2009*). D'autres effets sur le comportement, le fonctionnement du système immunitaire, la perméabilité intestinale...sont également fortement suspectés (*Zalko, 2010*). L'ANSES fournit, dans un rapport d'expertise de 2011, une synthèse des différents effets observés à ce jour chez l'animal pour des doses d'exposition au BPA inférieures à 5 mg/kg/jour. Selon ce rapport, les effets avérés, c'est-à-dire démontrés par plusieurs études, sont (*ANSES, 2011*) :

- *une augmentation de la survenue de kystes ovariens lors d'expositions pré et postnatales*
- *des modifications hyperplasiques de l'endomètre lors d'expositions pré et postnatales*
- *un avancement de l'âge de la puberté lors d'expositions pré et post-natales*
- *une altération de la production spermatique lors d'expositions à l'âge adulte*
- *des modifications histologiques sur la neurogenèse lors d'expositions pré ou périnatale*
- *des effets sur la lipogenèse suite à une exposition prénatale, périnatale ou à l'âge adulte*
- *des effets sur la glande mammaire : accélération de la maturation architecturale de la glande mammaire à l'âge adulte et développement de lésions hyperplasiques intra-canalaires lors d'exposition pré ou périnatale.*

Chez l'homme, il est difficile, à partir des études épidémiologiques, d'établir une relation de cause à effet entre l'exposition au BPA et une perturbation endocrinienne. Une corrélation positive a été montrée, chez l'homme et la femme, entre les concentrations urinaires de BPA et les concentrations libres et totales de testostérone (*Takeuchi et al, 2002*). Une association inverse entre les concentrations urinaires de BPA et les concentrations plasmatiques de FSH a aussi été observée chez des ouvriers appliquant les résines époxy sur les contenants alimentaires (*Hanaoka et al, 2002*). Les hommes exposés au BPA dans le cadre de leur emploi ont plus de risque de manifester une baisse de la libido et des troubles de l'érection (*Li et al, 2010*). L'extrapolation à l'homme des effets observés chez les rongeurs est difficile compte tenu des différences interspécifiques de toxicocinétique du BPA. Dans son rapport d'expertise, contrairement aux conclusions avancées chez l'animal, l'ANSES conclut ainsi à une insuffisance de données pour affirmer des effets avérés d'une exposition au BPA chez l'homme. Au regard des études disponibles, les effets du BPA peuvent uniquement être suspectés, c'est-à-dire montrés par une ou plusieurs études convergentes sans limite méthodologique majeure. Ces effets sont les suivants :

- *des anomalies de la maturation ovocytaire dans un contexte de procréation médicalement assistée*
- *des pathologies cardiovasculaires et du diabète (une seule étude transversale).*

I.4.2. Mode d'action du Bisphénol A

Le BPA est un perturbateur endocrinien qui a une structure chimique proche de celle des œstrogènes naturels. Le groupement phénol hydroxylé du BPA se retrouve en effet dans la structure chimique de l'œstradiol (figure 4) et explique l'activité œstrogéno-mimétique du BPA (*Dodds et al, 1936*).

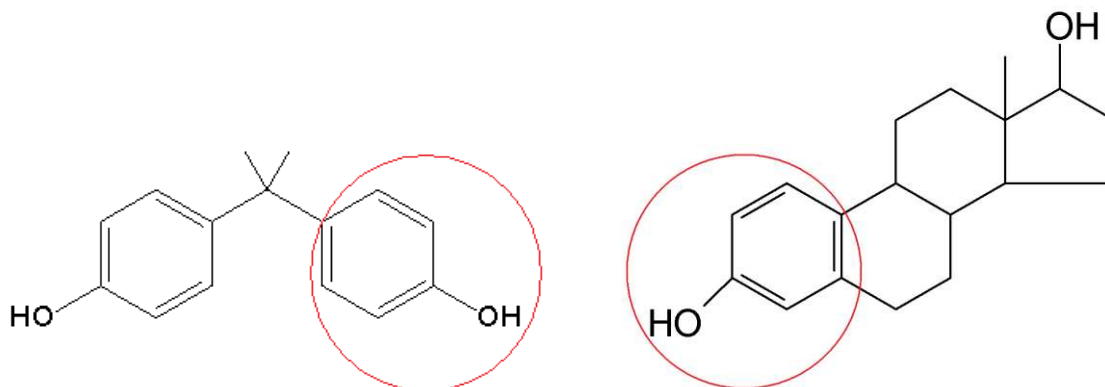


Figure 4. Structure chimique du Bisphénol A (à gauche) et de l'œstradiol (à droite).

Il est maintenant admis que le BPA agit par le même mécanisme d'action que les œstrogènes. Il se lie aux récepteurs nucléaires aux œstrogènes (ER), ER α et ER β , avec une affinité dix fois supérieure pour le récepteur β par rapport aux ER α dans les différents tissus cibles (*Whelshons et al, 2006*). De plus, le BPA peut aussi agir, à de faibles doses, via des récepteurs membranaires (*Whelshons et al, 2006*).

Le BPA est cependant considéré comme un composé à activité œstrogénique faible car il est beaucoup moins puissant que les œstrogènes naturels. A titre d'exemple, il stimule la prolifération de cellules cancéreuses mammaires humaines MCF-7 avec une EC50 (l'EC50 représente la concentration d'un composé pour laquelle 50% de l'effet maximal est observé) égale à $1.77 \cdot 10^{-6}$ mmol/L alors que cette stimulation est 1000 fois plus puissante dans le cas de l'œstradiol (EC50= $1.66 \cdot 10^{-9}$ mmol/L) (*Olsen et al, 2003*).

Bien que le mécanisme majeur d'action du BPA passe par la liaison aux ER, Singleton et al ont montré que, à de fortes concentrations, le BPA pouvait réguler l'expression de différents gènes impliqués dans la croissance et le développement tels que les gènes HOXC1 et HOXC6, ce qui n'est pas le cas de l'œstradiol (*Singleton et al, 2006*). Le BPA n'interfère donc

pas uniquement avec les récepteurs aux œstrogènes. D'ailleurs, il est aussi capable de se lier à d'autres récepteurs tels que les récepteurs aux androgènes et à ceux des hormones thyroïdiennes (*Wheterill et al, 2007*).

I.5. Contexte de notre étude

I.5.1. Choix du modèle ovin

Les effets d'une exposition in utero à de faibles doses de BPA observés chez l'animal, notamment chez le rat, associés à l'impossibilité d'évaluer l'exposition interne fœtale au BPA chez l'homme, justifient la nécessité de développer des modèles expérimentaux animaux pertinents pour répondre à la question du risque pour la santé humaine lié à l'exposition in utero à de faibles doses de BPA.

Le modèle ovin a été choisi dans notre étude car des travaux réalisés dans le laboratoire montrent que c'est un modèle pertinent vis-à-vis de l'homme en terme de toxicocinétique du BPA (*Collet et al, 2010*). Dans cette étude, la clairance moyenne du BPA chez la brebis a été évaluée à 54.1 ± 24.7 mL/kg/min et le temps de demi-vie du BPA était de 2.1 ± 1.8 h. La clairance plasmatique du BPA chez l'homme a été estimée à 30 mL/kg/min (*Völkel et al, 2002*).

D'autre part, la brebis gravide est considérée comme un modèle pour l'étude de la gestation chez l'homme car il existe des similitudes physiologiques entre les deux espèces et il est facile d'obtenir des prélèvements de manière répétée chez la mère et le fœtus instrumenté, tout en maintenant des conditions de vie éthiquement acceptables (*Barry et al, 2008*). Le modèle ovin constitue donc un modèle intégratif pertinent qui permet d'étudier la toxicocinétique du BPA dans l'unité fœto-materno-placentaire.

I.5.2. Objectifs de l'étude

Sur le modèle physiologique de la brebis gravide, les objectifs de notre étude étaient:

- évaluer l'effet de la gestation sur la toxicocinétique du BPA et du BPA-glucuronide chez la mère
- évaluer les paramètres toxicocinétiques du BPA et du BPA-glucuronide chez le fœtus à 4 mois d'âge conceptionnel

- évaluer les passages transplacentaires materno-fœtal et fœto-maternel du BPA et du BPA-glucuronide à 4 mois d'âge gestationnel.

II. Matériels et méthodes

L'objectif du présent travail était de documenter l'exposition interne au BPA de chacun des compartiments du complexe fœto-maternel, dans le modèle ovin, à différents stades physiologiques, afin de mettre en évidence une éventuelle surexposition de la mère et/ou de son fœtus au BPA et/ou à son métabolite pendant la gestation.

Les concentrations plasmatiques maternelles et fœtales en BPA et BPA-glucuronide, ainsi que les concentrations dans le liquide amniotique, ont été décrites au cours de la gestation.

- Pour déterminer si la gestation modifie la toxicocinétique du BPA chez la mère, les paramètres toxicocinétiques du BPA ont été évalués, après une perfusion IV de BPA de 2 mg/kg/jour pendant 24h, chez des brebis à quatre stades physiologiques : 1 mois avant la gestation, 1 et 4 mois d'âge conceptionnel et 1 mois après la mise-bas.
- A 4 mois d'âge conceptionnel, l'étude a été divisée en deux volets. Les fœtus de 12 brebis ont été équipés de cathéters chroniques jugulaire, carotidien et amniotique.
 - Dans le premier volet de l'étude, du BPA et du BPA-glucuronide ont été administrés à 8 brebis par perfusion IV sur 24 h aux doses respectives de 2 mg/kg/jour et 3.54 mg/kg/jour suivant un plan en cross-over. Ce volet a permis de décrire la cinétique du BPA et de son métabolite principal pendant la gestation mais également, le passage du BPA et du BPA-glucuronide du compartiment maternel vers le compartiment fœtal.
 - Dans le second volet, le BPA et le BPA-glucuronide ont été administrés au fœtus de 5 autres brebis, par perfusion IV sur 24 h, via un cathéter jugulaire, à des doses respectives de 5 mg/kg/jour et 3.54 mg/kg/jour selon un plan en cross-over. Ce dispositif a permis de décrire les paramètres toxicocinétiques du BPA et de son métabolite principal chez le fœtus et d'évaluer leur passage du compartiment fœtal vers le compartiment maternel.

Parallèlement à l'ensemble de ces mesures, la fraction de BPA lié aux protéines plasmatiques a été évaluée par la méthode de dialyse à l'équilibre aux 4 stades physiologiques chez 5 mères et à 4 mois d'âge gestationnel chez 3 fœtus.

II. 1. Plan expérimental

La phase animale a débuté en octobre 2010, au moment de l'arrivée des 25 agnelles en bergerie et s'est terminée en juillet 2011. La frise chronologique (figure 5) présente les différentes étapes de cette étude.

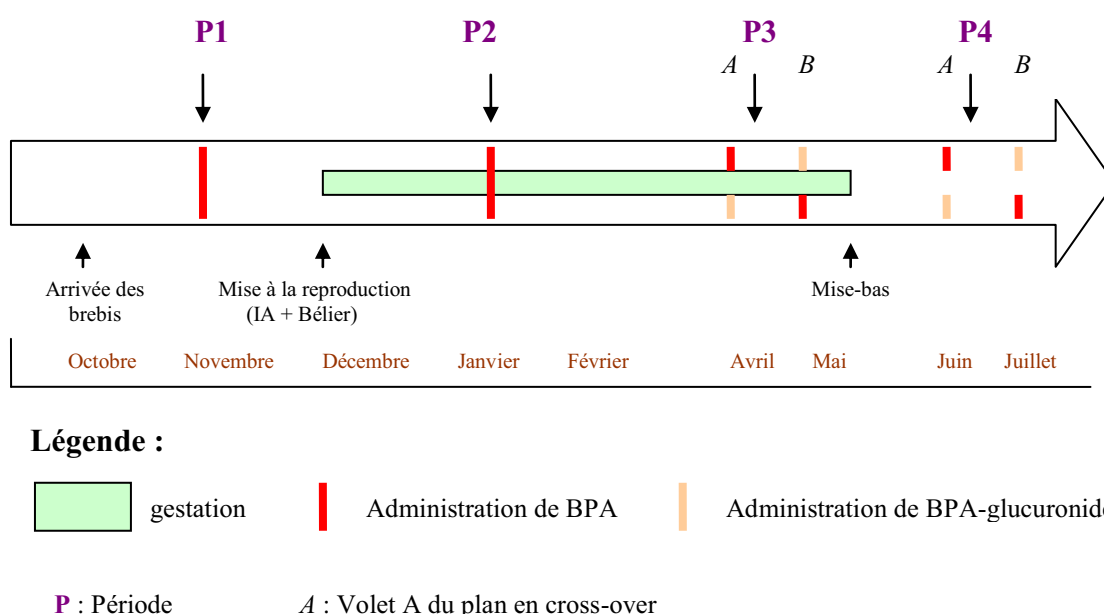


Figure 5. Organisation temporelle des différentes étapes de l'étude longitudinale.

Les réalisations expérimentales ont été effectuées sur quatre périodes :

- **Période 1 (P1) :**

Cette période de calibration s'est déroulée au mois de novembre 2010 et correspond au stade physiologique de 1 mois avant la mise à la reproduction. 20 brebis, vides, ont reçu une perfusion IV de BPA de 2 mg/kg/jour sur 24 h, afin de décrire l'exposition interne au BPA chez ces brebis 1 mois avant la mise à la reproduction.

- **Période 2 (P2) :**

Cette période s'est déroulée fin janvier-début février 2011 et correspond au stade physiologique de 1 mois après le début de la gestation. Elle a été réalisée sur 15 brebis gravides, dont la fécondation a eu lieu 1 mois auparavant. Ces brebis ont reçu une perfusion IV de BPA à la dose de 2 mg/kg/jour sur 24 h, afin de décrire l'exposition interne au BPA chez ces animaux à 1 mois de gestation.

- **Période 3 (P3) :**

Cette période s'est déroulée en avril et mai 2011 et correspond au stade physiologique de 4 mois d'âge gestationnel. Elle se compose de deux expérimentations. Une première expérimentation a consisté à administrer du BPA et du BPA-glucuronide à 9 brebis gravides via une perfusion IV de 24h afin de décrire l'exposition interne au BPA/BPA-glucuronide à ce stade de la gestation et d'évaluer leur passage dans le compartiment fœtal. Dans la seconde expérimentation, du BPA et du BPA-glucuronide a été administré directement à 9 fœtus, via un cathéter placé dans la veine jugulaire, par une perfusion de 24h, afin d'évaluer non seulement l'exposition interne du BPA et de son métabolite chez le fœtus, mais aussi leur passage dans le compartiment maternel.

Ainsi, cette période a été précédée d'une phase chirurgicale pendant laquelle les fœtus de 24 brebis (1 des 25 brebis entrées en bergerie a avorté à 71 jours de gestation, brebis notée O) ont été instrumentés. Un cathéter jugulaire et un cathéter amniotique ont été posés sur les fœtus de 13 brebis destinées à la réalisation du volet 1. Les brebis ayant participé à P1 et P2 ont été choisies pour constituer ce groupe de 13 brebis. Des cathéters jugulaires, amniotiques et carotidiens ont été mis en place sur les fœtus de 11 autres brebis destinées à l'expérimentation 2 de l'étude.





Chacune de ces expérimentations a été divisée en deux volets (A et B) séparées d'une semaine selon un plan en cross-over. Pour chacune des expérimentations, une partie des animaux, déterminée aléatoirement, a reçu une perfusion de BPA et l'autre une perfusion de BPA-glucuronide pendant le volet A, et vice versa pour le volet B. Sur les 24 animaux opérés, 18 (10 pour l'expérimentation 1 et 8 pour l'expérimentation 2) ont pu participer en totalité au volet A (4 brebis ont été écartées de cette période car les cathéters fœtaux étaient sortis de la

veine jugulaire et 2 brebis ont présenté ce dysfonctionnement des cathéters fœtaux au cours du volet A) et le volet B a pu être réalisé entièrement sur 15 d'entre elles (9 pour l'expérimentation 1 et 6 pour l'expérimentation 2). En effet, 2 avortements sont survenus entre les volets A et B et le cathéter carotidien est sorti de la veine fœtale au cours du volet B. Le tableau 3 décrit l'ensemble des expériences de la période 3.

Tableau 2. Organisation du plan en cross-over de la période 3.

	Volet A	Période	Volet B
Expérimentation 1: Administration maternelle	5 brebis gravides + 1 brebis vide	de « wash-out » d'une semaine	4 brebis gravides
	5 brebis gravides		5 brebis gravides + 1 brebis vide
Expérimentation 2: Administration fœtale	4 brebis gravides		2 brebis gravides
	4 brebis gravides		4 brebis gravides
Total	18 + 1 brebis vide		15 + 1 brebis vide

Légende :

-  Brebis de l'expérimentation 1 ayant reçu du BPA au volet A et du BPA-glucuronide au volet B
-  Brebis de l'expérimentation 1 ayant reçu du BPA-glucuronide au volet A et du BPA au volet B
-  Brebis de l'expérimentation 2 dont le fœtus a reçu du BPA au volet A et du BPA-glucuronide au volet B
-  Brebis de l'expérimentation 2 dont le fœtus a reçu du BPA-glucuronide au volet A et du BPA au volet B

La brebis O, ayant avorté à 71 jours de gestation, a aussi participé à l'ensemble de cette période, comme brebis satellite.

• **Période 4 (P4) :**

La période 4 s'est déroulée en juin-juillet 2011. Elle correspond au stade physiologique de 1 mois après la mise-bas. 9 brebis, qui ont participé aux 3 périodes précédentes dans leur totalité et qui faisaient partie du lot administration maternelle lors de la période 3, ainsi que la brebis O, ont reçu du BPA et du BPA glucuronide par perfusion IV sur 24 h. Cette période a également été divisée en deux volets (A et B) séparée d'une semaine selon un plan en cross-

over présenté dans le tableau 4. Cette période correspond à une période de calibration et a permis de décrire l'exposition interne au BPA et à son métabolite un mois après la mise-bas.

Tableau 3. Organisation du plan en cross-over de la période 4.

	Volet A	Période de « wash-out » d'une semaine	Volet B
Administration maternelle	4 brebis + brebis O		5 brebis
	5 brebis		4 brebis + brebis O
Total	10 brebis		10 brebis

Légende :



Brebis ayant reçu du BPA au volet A et du BPA-glucuronide au volet B



Brebis ayant reçu du BPA-glucuronide au volet A et du BPA au volet B

L'annexe 1 présente la répartition des 25 brebis sur les 4 périodes et sur les séquences en cross-over des périodes 3 et 4.

II.2. Animaux

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec les exigences de la législation française concernant les animaux de laboratoire sous le numéro d'autorisation d'expérimentation animale 311155545.

L'étude a été réalisée sur 25 brebis de race Lacaune viande pubères âgées d'au moins six mois au début du protocole.

Le nombre de brebis a été déterminé au préalable en prenant en compte une fertilité des animaux de 90 % (insémination artificielle et lutte naturelle pour les brebis revenant en chaleur) et un taux de réussite de cathétérisation des fœtus qui avait été estimé à 60 % (en prenant en compte une période de mise au point de la méthode), conduisant à 14 brebis dont l'un des fœtus pourrait avoir un cathéter fonctionnel à 4 mois d'âge conceptionnel. Ces prévisions se sont avérées correctes puisque nous avons obtenu 24 brebis gravides à 4 mois de gestation et 15 brebis instrumentées dont les cathéters sanguins fœtaux sont restés fonctionnels pendant toute la période 3.

II.2.1. Conditions de vie

Les animaux ont été logés en boxes collectifs et nourris avec des granulés Brebilac[®] (500g par jour, en un seul repas), associés à de la paille et du foin à volonté. La ration a été adaptée au stade physiologique. Les animaux étaient abreuvés *ad libitum*. La période d'habitation à ces conditions de vie a été d'un mois avant le début du protocole.

Deux jours avant le début des perfusions, les brebis ont été placées en box individuel. A la fin de chacune des périodes de prélèvements, les animaux regagnaient les boxes collectifs. Les brebis dont le fœtus a été cathétérisé ont été placées en box individuel après l'intervention chirurgicale et ce jusqu'à l'agnelage. Les interactions sociales entre animaux ont été préservées.

II.2.2. Prophylaxie sanitaire

A leur arrivée, les brebis ont été déparasitées avec de l'ivermectine : une injection sous-cutanée (SC) en arrière de l'épaule d'Ivomec ovin[®] à la posologie de 1 mL/50kg de poids vif, soit 200 µg/kg de poids vif d'ivermectine.

Les brebis ont aussi été vaccinées contre les principales maladies abortives. Le protocole vaccinal, présenté ci-dessous, a été terminé un mois avant la mise à la reproduction :

1. Chlamydie : vaccin Cevac Chlamydia[®], 1 injection de 2 mL par voie SC
2. Fièvre Q : vaccin Coxevac[®], 2 injections de 2 mL par voie SC à 3 semaines d'intervalle
3. Border Disease : vaccin Mucosiffa[®], 1 injection de 2 mL par voie intramusculaire (IM)

II.2.3. Mise à la reproduction

Les 25 brebis ont été mises à la reproduction un mois après le début de la période 1.

Les chaleurs des animaux ont été synchronisées à l'aide de traitements progestagènes : éponges vaginales contenant 20 mg d'acétate de flugestone (Chronogest[®] CR, Intervet, Angers, France) laissées en place pendant 14 jours, puis injection IM de 280 UI de PMSG, (Chronogest[®] PMSG, Intervet, Angers, France) au retrait des éponges.

53 h après le retrait des éponges, les 25 brebis ont été inséminées avec un mélange de semences de 3 béliers. Un bélier de race Lacaune a ensuite été introduit 11 jours plus tard pour assurer la saillie de 12 brebis revenues en chaleur. Le bélier portait un harnais avec un système de marquage afin de suivre les dates de saillie.

Le diagnostic de gestation a ensuite été effectué par dosage des PAG, réalisé au Laboratoire de Physiologie Animale de Sart Tilman (4000, Belgique). Le premier dosage des PAG effectué sur les 13 brebis inséminées et non revenues en chaleur a montré que toutes ces brebis étaient gravides. Le second dosage des PAG, réalisé 25 jours après l'introduction du bélier, sur les 12 brebis revenues en chaleur et remises à la reproduction en monte naturelle, a permis d'établir un diagnostic de gestation positif. Ces diagnostics ont été confirmés par échographie à 40 jours de gestation. Le nombre de fœtus a également été évalué : sur 25 gestations, 10 ont été diagnostiquées simples et 15 doubles ou triples.

II.2.4. Agnelages

13 agnelages à terme ont eu lieu naturellement ou avec une aide pour 4 brebis sur 13 brebis ayant mis bas à terme. Les nouveau-nés ont été séparés de leur mère à la naissance et euthanasiés (Pentobarbital, 5 mL Dolethal® IV). Le tableau 4 présente la répartition du poids des nouveau-nés en fonction du nombre de fœtus dans la portée et de leur sexe.

Tableau 4. Moyenne des poids à la naissance des agneaux en fonction du nombre de fœtus dans la portée et du sexe.

	5 portées de 1 fœtus	6 portées de 2 fœtus	2 portées de 3 fœtus
Poids des mâles	-	3.37±0.38 (n=6)	2.78±0.70 (n=4)
Poids des femelles	3.73±0.39 (n=5)	2.72±0.59 (n=6)	2.25±0.18 (n=2)
Poids moyens	3.73±0.39 (n=5)	3.04±0.58 (n=12)	2.60±0.61 (n=6)

II.3. Préparation des solutions à administrer

Le BPA utilisé est sous forme de poudre blanche (Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France). Le BPA-glucuronide a été obtenu après collecte et purification des urines (Lacroix *et al*, 2011) de 3 brebis ayant reçu du BPA par VO (bolus) à la dose de 100 mg/kg.

Les solutions de BPA et de BPA-glucuronide à perfuser ont été préparées le matin du jour de début des perfusions. Le solvant du BPA était un mélange d'Ethanol/Propylènglycol

de rapport volume : volume de 1/49. Le BPA-glucuronide a été dilué dans du sérum physiologique. Les concentrations de ces solutions ont été ajustées au poids de l'animal, mesuré dans les 3 jours précédant le lancement des perfusions et au débit de perfusion afin d'obtenir le taux de perfusion souhaité. Pour les solutions directement administrées aux fœtus, le poids corporel a été arbitrairement fixé à 2.5 kg (*Bazer et al, 2012*).

Afin d'éviter une contamination de ces solutions par du BPA, leur préparation a été réalisée avec du matériel jetable qui ne contenait pas de BPA. D'autre part, les solutions destinées aux administrations fœtales ont été préparées, dans la mesure du possible, de façon stérile : dilution des solutions sous la hotte, utilisation de matériel stérile, filtration des solvants (filtre millipore 0.2 µm).

La dissolution du BPA et du BPA-glucuronide et leur stabilité à température ambiante et à 37°C pendant 24 h ont été testées au préalable.

II.4. Procédures expérimentales

II.4.1. Mise en place chirurgicale des cathéters fœtaux et amniotiques

Les brebis ont été opérées à 113 ± 3 jours de gestation (étendue : 108-117 jours).

Les animaux ont été mis à la diète la veille de la chirurgie. Les brebis ont reçu de l'acide propionique (Rumigastryl[®], ¼ sachet dilué dans 100 mL d'eau, VO) la veille, le soir et le lendemain du jour de la chirurgie. Une antibiothérapie à base d'amoxicilline (Clamoxyl[®] LA, 20mg/kg IM) a débuté la veille de l'opération.

Une prémédication à base d'acépromazine (Calmivet[®], 0.1 mg/kg IM) et d'acide tolfénamique (Tolfine[®], 2 mg/kg IV) a été effectuée 30 minutes avant de débiter la chirurgie. L'anesthésie générale a été induite avec du thiopental sodique (Nesdonal[®], 15 mg/kg IV en deux fois) et relayée avec de l'isoflurane 1-1.5 %. Pendant la phase chirurgicale, l'animal a reçu une perfusion IV de Ringer Lactate au débit de 10 mL/kg/h.

Les brebis ont été placées en décubitus latéral droit. La zone opératoire a été lavée et désinfectée. Une anesthésie locale traçante (plans musculaires et sous-cutanés) à l'aide de lidocaïne (Lurocaïne 2%[®], 10 injections de 1mL) a été réalisée sur le flanc gauche. La peau a été incisée sur 20 cm dans le flanc gauche en direction crânio-ventrale, à partir du pli du grasset. Les parois musculaires et le péritoine ont été incisés plan par plan. Une partie de la

corne utérine a été extériorisée au niveau de la tête du fœtus. L'hystérotomie a été réalisée au niveau de la grande courbure de l'utérus et des pinces en cœur ont été disposées, au fur et à mesure, sur toute l'ouverture pour maintenir la paroi de l'utérus avec les enveloppes chorio-amniotiques, de façon à éviter les pertes de liquide amniotique. La tête du fœtus a été extériorisée. La peau du cou du fœtus a été incisée au niveau du sillon jugulaire sur 1 à 2 cm. La veine jugulaire et l'artère carotide ont ensuite été disséquées. Des ligatures en soie ont été passées autour de ces vaisseaux pour les maintenir et éviter les saignements lors de la cathétérisation. Les vaisseaux ont été ouverts avec une aiguille rose 18G recourbée, qui sert aussi de guide pour insérer l'extrémité du cathéter. Les caractéristiques des cathéters utilisés sont présentées dans le tableau 5. Les cathéters ont ensuite été introduits jusqu'à la crosse aortique dans le cas du cathéter carotidien et jusqu'à la veine cave supérieure dans le cas du cathéter jugulaire. Leur fonctionnement a été contrôlé par aspiration de sang. Les cathéters ont été fixés par deux ligatures (soie 3-0 ;2.5 Ph-Eur ; Ethicon Rome, Italie) situées en amont et en aval du point d'ouverture du vaisseau (figure 6).

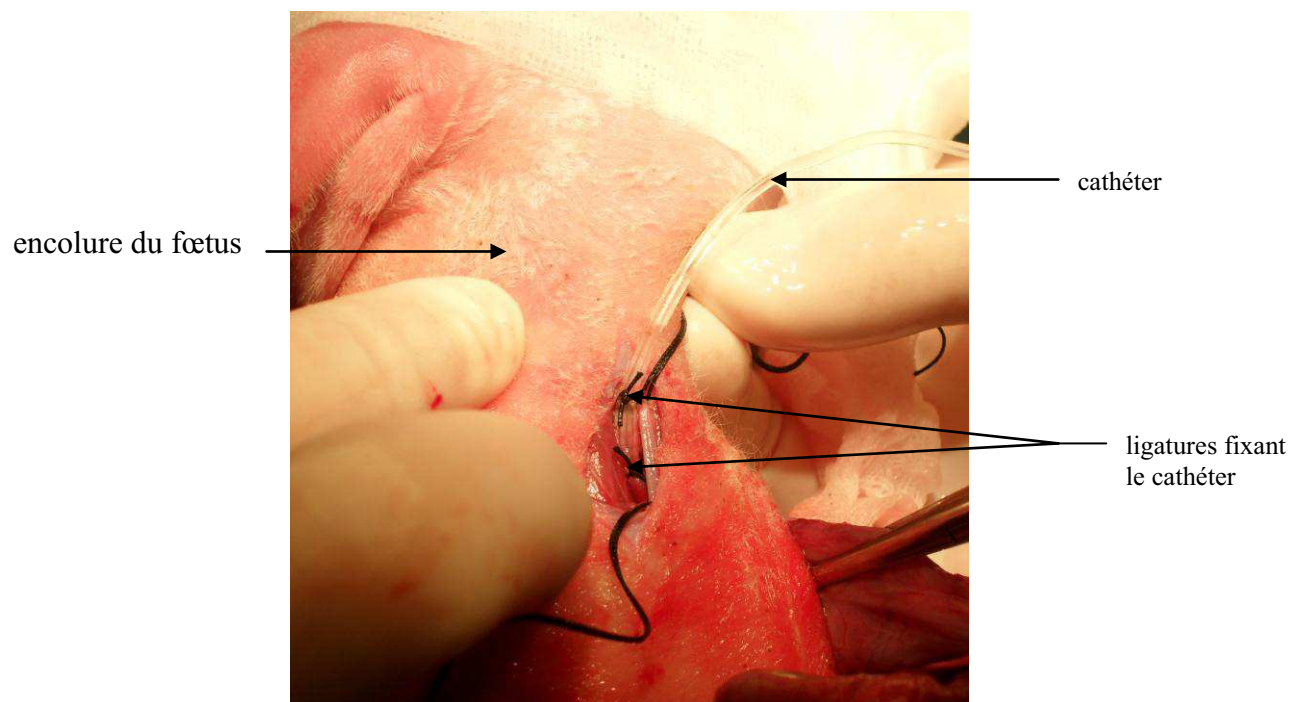


Figure 6. Cathéter jugulaire fixé dans la veine jugulaire.

- Leur fonctionnement a été à nouveau contrôlé. La peau du fœtus a ensuite été suturée (tresse polyester (Mersuture n°2-0, 3 Ph-Eur) et les cathéters ont été fixés à la peau par un

ou deux points simples. Le cathéter amniotique a été fixé au menton du fœtus. La tête du fœtus a été replacée délicatement dans l'utérus. L'utérus a été refermé, en incluant les enveloppes fœtales, par un surjet simple et un surjet enfouissant (fils sertis: Vicryl n°1, 4 Ph-Eur). Les cathéters ont été extériorisés au niveau de la plaie utérine. Les plans musculaires et cutané ont ensuite été suturés (figure 7), les cathéters ont été tunnélisés dans le plan sous-cutané sur 10 cm dorsalement à l'incision et ont été extériorisés dans le flanc au niveau d'une petite incision cutanée de 0.5 cm.

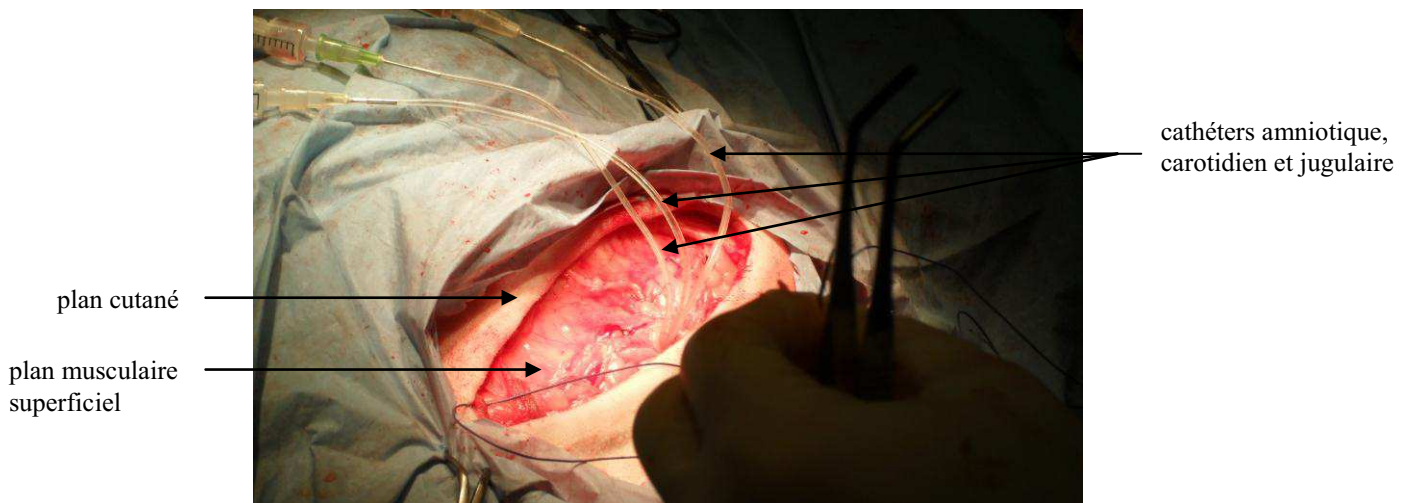


Figure 7. Cathéters amniotique, carotidien et jugulaire extériorisés après sutures des plans musculaires.

Les cathéters ont été externalisés un à un et fixés par des points simples à leur sortie. Chaque cathéter a été obturé par un bioconnecteur « auto-flush » (Vygon[®], Ecoen, France). Les embouts des cathéters ont été entourés d'une compresse stérile imbibée de Vétédine[®] solution et maintenus dans des poches plastiques.

Tableau 5. Caractéristiques des cathéters fœtaux et amniotiques.

Cathéter	Origine, matière	Diamètre interne (mm)	Diamètre externe (mm)	Longueur (mm)	Aiguille coupée
Amniotique	Microtube Tygon [®] , S-54-HL, Saint-Gobain, Courbevoie, France	1.02	1.78	800	blanche 19G
Carotidien	Polyvinyle Medical Tubing [®] , Le Bousquet d'Orb, France	0.75	1.45	800	verte 21G
Jugulaire	Microtube Tygon [®] , S-54-HL, Saint-Gobain, Courbevoie, France	1.02	1.78	800	blanche 19G

La récupération post-chirurgicale des animaux a été rapide : les brebis se relevaient dès le retour en box et la reprise de l'appétit avait lieu le jour même.

Après la chirurgie, le fonctionnement des cathéters a été vérifié chaque jour. Les cathéters sanguins ont été rincés quotidiennement avec du sérum physiologique hépariné (100 UI/mL) et le cathéter amniotique a été rincé avec du sérum physiologique. Afin d'éviter toute infection, la préparation des solutions destinées à ces injections et le remplissage des seringues (BD Discardit II, 2mL, Le Pont-de-Claix, France) a été réalisée sous la hotte dans des conditions d'asepsie rigoureuse.

Le lendemain de la chirurgie, la couverture antibiotique a été poursuivie avec de l'amoxicilline (Clamoxyl[®] LA, 15 mg/kg IM). Une seule brebis a été traitée avec de l'acide tolfénamique (Tolfine[®], 15 mL/50 kg) IM) car elle manifestait des signes de douleur.

Sur les 24 brebis opérées, 5 animaux ont avorté (de 10 à 26 jours post-chirurgie) et 6 autres ont été euthanasiées, afin de déterminer l'origine du non-fonctionnement des cathéters fœtaux. Ainsi, il a été constaté qu'un serrage insuffisant de la ligature du vaisseau ne permettait pas de maintenir les cathéters dans les vaisseaux sanguins alors qu'un serrage trop important les obstruait et les rendait inutilisables. De plus, la longueur de cathéter placée dans le vaisseau influençait sa fonctionnalité. Avec la croissance fœtale, les cathéters bien que toujours en place dans la veine jugulaire se retrouvaient dans une partie de la veine dans laquelle le flux de sang était arrêté et n'étaient donc plus fonctionnels.

II.4.2. Modalités des administrations de BPA et de son métabolite

- **Administrations maternelles de BPA et de BPA-glucuronide**

Pour chacune des périodes, le BPA a été administré aux mères par perfusion IV à la dose de 2 mg/kg/jour pendant 24 h. Cette dose a été choisie car elle permet d'atteindre des concentrations plasmatiques de BPA total de l'ordre de 20 ng/mL (*Collet et al, 2010*).

Lors des périodes 3 et 4, les doses de BPA-glucuronide administrées aux brebis et aux fœtus ont été de 3.54 mg/kg/jour (ce qui est équivalent en mole/kg à une dose de BPA de 2 mg/kg/jour), par perfusion IV sur 24h.

Les administrations maternelles ont été effectuées via un cathéter (Hémocath[®], Vygon) mis en place dans la veine jugulaire gauche la veille des perfusions. La perfusion a été assurée par un injecteur portatif (MS32, Sims Graseby[®]), réglé à un débit de 0.5 mL/h. La solution à perfuser était contenue dans une seringue (BD Plastipak, embout LuerLock) de 20 mL, placée dans cet injecteur. Le débit de perfusion a été de 0.5 mL/h : un pulse de 32 µL est envoyé par l'injecteur toutes les 4 minutes. En 24 heures, le volume perfusé est donc de 12 mL. Ce dispositif est placé dans une boîte en aluminium fixée sur le dos de la brebis à l'aide d'un harnais (cf. figure 8). Un trou placé dans cette boîte permet le passage d'un prolongateur (Vygon[®], Ecoen, France) reliant l'injecteur au cathéter.



Figure 8. Brebis munie du dispositif de perfusion.

- **Administrations fœtales de BPA et de BPA-glucuronide**

Les administrations fœtales ont été réalisées via le cathéter placé dans la veine jugulaire du fœtus. Les injecteurs utilisés sont identiques aux injecteurs maternels. Au début de l'expérimentation, sur 3 fœtus, la dose administrée de BPA a été de 2 mg/kg/jour avec un débit de perfusion de 0.5 mL/h, et la dose de BPA-glucuronide a été de 3.54 mg/kg/jour. Ceci correspondait à un volume de solution injectée de 720 µL, qui était placé dans une seringue de 1 mL. Les résultats préliminaires obtenus sur ces 3 premières brebis ayant participé au volet A des administrations fœtales de BPA et de BPA glucuronide ont montré que les concentrations plasmatiques de BPA étaient proches de la LOQ, ce qui nous a conduit à changer la procédure afin d'atteindre des niveaux détectables de BPA dans le plasma fœtal.

La dose de BPA à perfuser aux fœtus a donc été de 5 mg/kg/jour pour la suite de la période 3. Une seringue de 20 mL (BD Plastipak, embout LuerLock) a été placée dans l'injecteur, réglé en position 0.3 mL/h. Le volume injecté sur 24 heures a été de 7.2 mL.

Le niveau de dose à perfuser de BPA-glucuronide a été de 3.54 mg/kg/jour. L'injecteur a été réglé à un débit de 0.5 mL/h. Une seringue de 20 mL (BD Plastipak, embout LuerLock) a été utilisée pour contenir la solution de BPA-glucuronide destinée aux administrations fœtales. Le volume perfusé sur 24 heures a été de 12 mL.

Les injecteurs utilisés pour les administrations fœtales ont été placés dans des boîtes en aluminium fixées sur le dos des brebis à l'aide d'un harnais. Ils sont reliés au cathéter jugulaire fœtal (après retrait du bioconnecteur « auto-flush ») via un prolongateur (Vygon[®], PE, Ecouen, France). Le fonctionnement de l'injecteur (clignotement au niveau de l'injecteur), l'avancement de la perfusion (diminution du volume de la solution dans la seringue) et les connexions entre le prolongateur, le cathéter et l'injecteur ont été vérifiés régulièrement au cours des 24 heures de perfusion.

Au lancement des perfusions, une quantité de 1 mL de la solution à administrer a été injectée dans le prolongateur, et aussi dans le cathéter pour les administrations fœtales, afin de combler les volumes morts.

A l'arrêt des perfusions, le volume restant dans les seringues de 20 mL a été enregistré, ainsi que le volume de solution aspiré du cathéter jugulaire fœtal.

II.4.3. Modalités des prélèvements

- **Prélèvements sanguins après les administrations maternelles de BPA et de BPA-glucuronide**

Suite aux administrations maternelles de BPA et de BPA-glucuronide, l'exposition interne au BPA et à son métabolite a été suivie à la fois chez les mères (périodes 1 à 4) et chez les fœtus (période 3), et dans le liquide amniotique (période 3). Le même schéma de prélèvements a été suivi pour les perfusions de BPA ou de BPA-glucuronide.

Chez les mères, pour les périodes 1, 2 et 4, 3 échantillons de sang ont été prélevés à 15 minutes d'intervalle avant le début des perfusions (contrôle), puis 6 échantillons (Pr4 à Pr9) ont été collectés entre la 21^{ème} et la 24^{ème} heure de perfusion (concentrations à l'équilibre). Après l'arrêt des perfusions, les prélèvements maternels ont été réalisés au temps 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes (Pr10 à Pr18), puis à 4, 6, 8, 10, 22, 34 et 46 heures (Pr19 à Pr25) afin de décrire la cinétique des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-glucuronide après l'arrêt des perfusions. Un total de 25 prélèvements sanguins maternels a ainsi été obtenu pour chacune des brebis par perfusion de BPA ou de BPA-glucuronide. Pour la période 3, le même schéma de prélèvement a été suivi à l'exception du prélèvement 2 minutes après l'arrêt de la perfusion qui n'a pas été effectué.

Ces prélèvements de sang, de 5 mL (Pr1 à Pr9) ou de 2 mL (Pr9 à Pr26), ont été réalisés par ponction directe dans la veine jugulaire droite avec une seringue (BD Discardit II 2 mL ou 5 mL) montée sur une aiguille de 21G. Les échantillons collectés ont ensuite été transférés dans un tube hépariné de 5 mL, puis placés immédiatement dans la glace.

Chez les fœtus, lors de la période 3, un nombre moins important de prélèvements a été réalisé en raison du plus faible volume sanguin par rapport à celui des mères. Avant le début des perfusions, 3 échantillons de sang (Prf1 à Prf3) ont été collectés à 15 minutes d'intervalle (contrôle). Entre la 21^{ème} et la 24^{ème} heure de perfusion, 6 prélèvements (Prf4 à Prf9) ont été réalisés (état d'équilibre). Enfin, après l'arrêt des perfusions, les échantillons ont été prélevés aux temps 15, 30, 60, 120 minutes (Prf10 à 14), puis à 4, 6, 8, 10, 22, 34, 46 heures (Prf15 à 21) puis tous les deux à trois jours jusqu'à la mise-bas.

Le sang fœtal a été prélevé via le cathéter placé dans la veine jugulaire pour le lot « administration maternelle » excepté pour une brebis dont le cathéter jugulaire n'était pas fonctionnel (prélèvement par le cathéter carotidien, brebis notée G). Le prélèvement de sang (1mL pour les prélèvements contrôle et ceux correspondant à l'état d'équilibre, 0.5 mL pour les prélèvements après l'arrêt de la perfusion) a été réalisé avec une seringue de 2 mL (BD Discardit II). Le cathéter sanguin a ensuite été rincé avec 2 mL de sérum physiologique hépariné. Les prélèvements fœtaux ont été réalisés de façon la plus aseptique possible. Ces prélèvements de sang fœtal ont ensuite été transférés dans des tubes en polypropylène (Fisher Scientific®, Strasbourg, F) héparinés de 3 mL (2 µL d'héparine par tube, 10 UI/tube, Héparine CHOAY 25000 UI), puis placés immédiatement dans la glace.

Des échantillons de **liquide amniotique** ont aussi été prélevés pendant la période 3. L'objectif était de récolter 3 échantillons à 15 minutes d'intervalle avant le lancement des perfusions, puis 6 échantillons entre la 21^{ème} et la 24^{ème} de perfusion, puis un échantillon par jour. Cependant, en fin de gestation, le liquide amniotique de certaines brebis était difficile à collecter car il était épais. Les 9 prélèvements de liquide amniotique n'ont donc pas pu être obtenus sur chacune des brebis.

Le liquide amniotique a été prélevé (1mL) via le cathéter amniotique puis le cathéter a été rincé avec 2 mL de sérum physiologique. Les prélèvements de liquide amniotique ont ensuite été transférés dans des tubes en polypropylène (Fisher Scientific®, Strasbourg, France) de 3 mL, puis placés immédiatement dans la glace.

- **Prélèvements suite aux administrations fœtales de BPA et de BPA-glucuronide**

Pendant la période 3, après les administrations fœtales de BPA ou de BPA-glucuronide, l'exposition interne à ces composés a été suivie chez les fœtus, les mères et dans le liquide amniotique. Les schémas et les méthodes de prélèvements suivis sont les mêmes que ceux utilisés pour les administrations maternelles, avec les particularités suivantes :

- un échantillon de sang fœtal supplémentaire a été collecté à 8 minutes après l'arrêt de la perfusion
- le premier prélèvement sanguin maternel a été réalisé 15 minutes après l'arrêt des perfusions
- le sang fœtal a été prélevé via le cathéter carotidien

II.4.4. Traitement des échantillons collectés

Les échantillons ont été centrifugés dans l'heure qui suit le prélèvement à 3000 g, à 4 °C pendant 10 minutes.

Après centrifugation, le plasma maternel a été aliquoté en 2 fractions (100µL et 500µL) dans des tubes Eppendorf® de 1.5mL pour les prélèvements Pr10 à Pr26. Le plasma des prélèvements Pr1 à Pr9 a été aliquoté en 4 fractions, 100µL pour les dosages de BPA et de BPA glucuronide, et le reste du plasma aliquoté en part égale dans trois autres tubes Eppendorf®. Ces fractions supplémentaires ont été utilisées pour évaluer la fraction de BPA non lié aux protéines plasmatiques par dialyse à l'équilibre.

Le plasma fœtal et le liquide amniotique ont été aliquotés en 2 fractions (100 µL et 200 µL ou 500 µL) dans des tubes Eppendorf® de 1.5 mL.

Ces tubes Eppendorf® ont ensuite été congelés à -20 °C jusqu'à la réalisation du dosage.

II.4.5. Dosages des échantillons

Les concentrations plasmatiques en BPA, BPA-glucuronide et BPA-sulfate ont été évaluées simultanément par chromatographie en phase liquide à ultra performance, couplée à la spectrophotométrie de masse (UPLC/SM/SM), après extraction à l'acétonitrile. La limite de quantification (LOQ) a été de 1 ng/mL pour le BPA, 50 ng/mL pour le BPA-glucuronide et de 2.1 ng/mL pour le BPA-sulfate. Les coefficients moyens de variation inter et intra dosage ont été inférieurs à 15 % pour chacune des molécules dosées (*Lacroix et al, 2011*).

II.4.6. Dialyse à l'équilibre

Le pourcentage de BPA libre a été évalué sur les prélèvements Pr4 à Pr6 (collectés dans les conditions d'équilibre en fin de perfusion de BPA) de 5 brebis gravides pour chacune des 4 périodes. La fraction de BPA libre a également été déterminée dans des pools de plasmas (collectés dans les conditions d'équilibre en fin de perfusion de BPA) de 7 fœtus (Prf4 à Prf6), faisant partie du lot administration fœtale.

Une solution de Bisphénol A tritié (10 Ci/mmol, 1mCi/ml, Moravek Biochemicals and radiochemicals®, Brea, USA) a été utilisée comme traceur (8800 dpm) et ajoutée dans le tampon de dialyse, ce qui correspond à 91.32 pg de BPA, soit environ 1 % de la quantité de

BPA froide dans le plasma. Dans les demi-cellules dialysat, ont donc été introduits 900 µL de solution tampon (1mM phosphate, pH=7.4) surchargé de BPA tritié. Dans l'autre demi-cellule séparée par une membrane de dialyse (seuil poids moléculaire : 5000 Da), ont été introduits 900 µL de plasma de brebis, ou 900 µL d'un pool de 3 échantillons plasmatiques fœtaux. Les cellules ont ensuite été placées pendant une heure dans un bain marie à la température de 37 °C. A la fin de l'incubation, les solutions de plasma et de tampon dialysés ont été prélevées. 9 mL de liquide de scintillation ont été ajoutés à 400 µL de plasma ou de tampon dialysés. La radioactivité a été mesurée avec un compteur à scintillation bêta.

La fraction de BPA libre (F) dans le plasma a été calculée selon l'équation suivante (équation 1).

$$F(\%) = \frac{dpm_{\text{tampon dialysé}}}{dpm_{\text{plasma dialysé}}} \quad \text{Equation 1}$$

II.5. Analyse des données

Les échantillons maternels des périodes 1 à 4 ont été dosés a posteriori sur un nombre de brebis de 4 à 6 suivant les périodes. L'ensemble des concentrations (ng/mL) ont été converties en concentrations molaires.

Les concentrations plasmatiques en BPA et BPA-glucuronide ont été analysées selon une approche non compartimentale à l'aide du logiciel Winnonlin® (5.3, Pharsight Corporation, CA, USA) et les paramètres pharmacocinétiques (Clairance, Volume de distribution, Aire sous la courbe, temps de demi-vie) ont été obtenus selon les équations de Perrier et Gibaldi (1982).

L'effet du statut physiologique sur les paramètres pharmacocinétiques du BPA a été déterminé grâce à un test d'analyse de variance à un facteur.

Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel Systat 12.0® (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

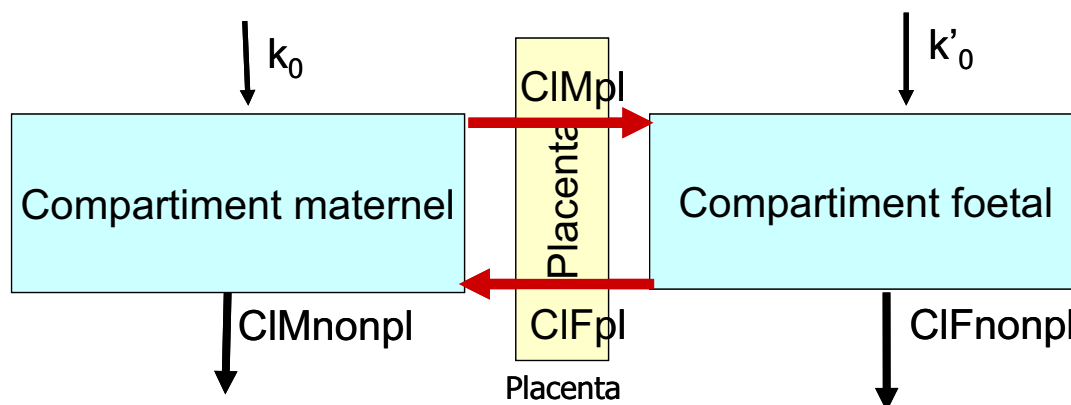
Les rapports (et les écarts-types) entre les concentrations maternelles et fœtales à l'équilibre de BPA, de BPA-glucuronide et de BPA-sulfate ont été évalués. L'effet du statut

physiologique sur les concentrations à l'état d'équilibre en BPA et BPA-glucuronide a été évalué grâce à un test d'analyse de variance à un facteur.

Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel Systat 12.0® (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Calcul des clairances non placentaires maternelle et fœtale et des clairances placentaires materno-fœtale et foeto-maternelle

Dans notre plan expérimental, les perfusions de BPA maternelle et fœtale n'ont pas été réalisées pour le couple brebis-fœtus. C'est pourquoi, les clairances placentaires et non placentaires du BPA chez la mère et le fœtus ont été calculées en prenant en compte les moyennes des concentrations plasmatiques de BPA à l'équilibre après les administrations maternelles et fœtales de BPA pour l'ensemble des animaux. Le modèle toxicocinétique ouvert à deux compartiments, décrit par Szeto et *al.*, (1982) a été utilisé (figure 9). Ce modèle prend en compte l'élimination du BPA, à la fois du compartiment maternel et fœtal.



Légende : CIMtot : Clairance maternelle totale, CIMnonpl : Clairance maternelle non placentaire, CIMpl : Clairance maternelle placentaire ; CIFtot : Clairance fœtale totale, CIFnonpl : Clairance fœtale non-placentaire, CIFpl : Clairance placentaire fœtale.

Figure 9: Modèle toxicocinétique bicompartimental ouvert, avec un compartiment maternel et fœtal, permettant de décrire les clairances maternelle et fœtale, placentaire et non placentaire. Le BPA est éliminé à la fois du compartiment maternel et du compartiment fœtal.

Les équations de Szeto utilisées sont les suivantes :

$$CIM_{tot} = k_0 / [C_{mss} - C_{fss}(C_{m'ss}/C_{f'ss})]$$

$$CIF_{tot} = k'_0 / [C_{f'ss} - C_{m'ss}(C_{fss}/C_{mss})]$$

$$CIM_{pl} = CIF_{tot}(C_{fss}/C_{mss})$$

$$ClF_{pl} = ClM_{tot} (C_{m'ss} / C_{f'ss})$$

$$ClM_{nonpl} = ClM_{tot} - ClM_{pl}$$

$$ClF_{nonpl} = ClF_{tot} - ClF_{pl}$$

Où k_0 et k'_0 sont les taux de perfusion de BPA respectivement à la mère et au fœtus ; C_{mss} et C_{fss} sont les concentrations plasmatiques à l'équilibre de BPA maternelles et fœtales après une perfusion maternelle de BPA et $C_{m'ss}$ et $C_{f'ss}$ sont les concentrations plasmatiques à l'équilibre de BPA maternelles et fœtales après une perfusion foetale de BPA.

III. Résultats

III.1. Effet de la gestation sur la toxicocinétique du Bisphénol A

III.1.1. Paramètres toxicocinétiques du Bisphénol A

La figure 10 illustre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de BPA chez 4 brebis à 4 stades physiologiques différents (Période 1 : 1 mois avant la gestation, Période 2 : 1 mois de gestation, Période 3 : 4 mois de gestation et Période 4 : 1 mois après la mise-bas) pendant et après une perfusion IV de BPA à la dose de 2 mg/kg/jour pendant 24 heures.

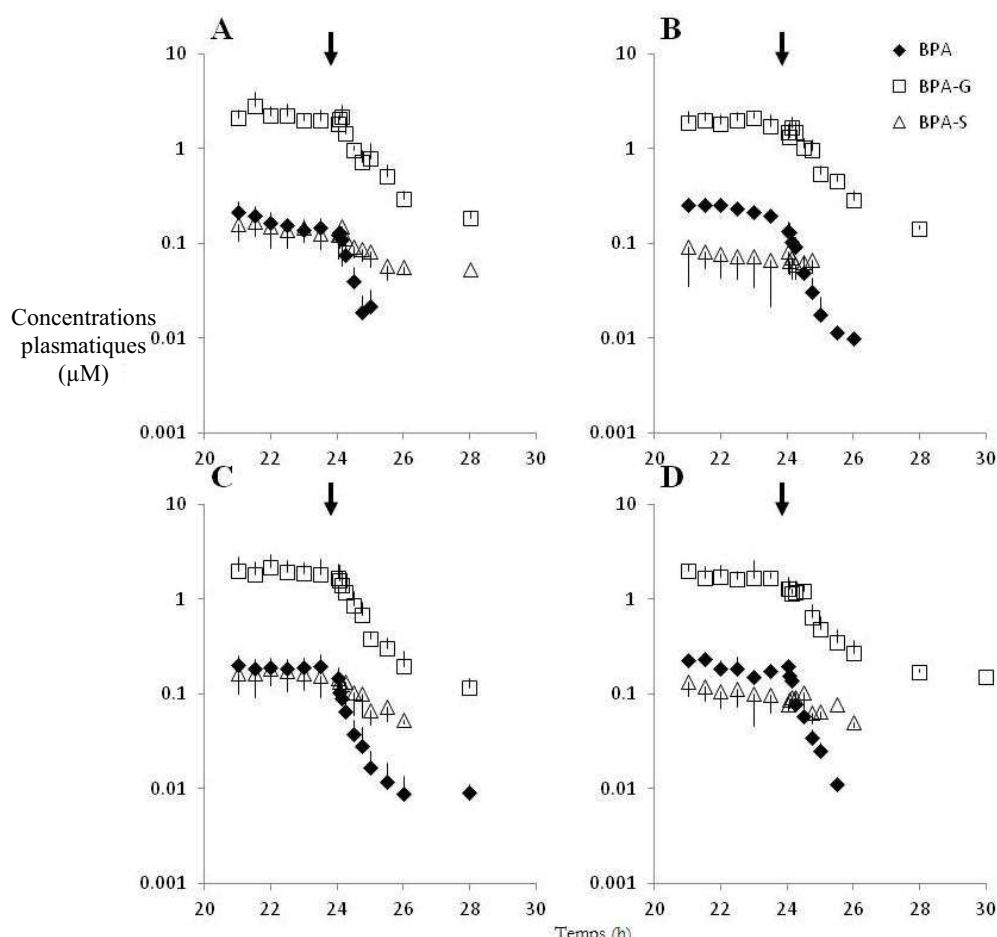


Figure 10. Concentrations plasmatiques de BPA et de ses métabolites pour quatre stades physiologiques différents (A - n=6 : 1 mois avant la gestation, B – n=6 : 1 mois de gestation, C – n=8 : 4 mois de gestation et D – n=4: 1 mois après la mise-bas) pendant et après une perfusion IV de BPA à la dose de 2 mg/kg/jour pendant 24 h. la flèche noire indique la fin de la perfusion.

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de BPA et de ses métabolites à la fin de la perfusion et après l'arrêt de celle-ci apparaît similaire pour chacun des quatre stades physiologiques.

Les concentrations de BPA à l'état d'équilibre sont du même ordre de grandeur pour chacune des quatre périodes (période 1 : 171.5 ± 49.8 nM, période 2 : 236.0 ± 45.6 nM, période 3 : 191.9 ± 45.8 nM, période 4 : 193.2 ± 45.3 nM). Les concentrations plasmatiques de BPA sont inférieures à la limite de quantification de 1 ng/mL dans les de 2 heures après l'arrêt des perfusions pour les quatre stades physiologiques.

Les concentrations moyennes à l'état d'équilibre, après la perfusion de BPA à 2 mg/(kg.j), de BPA, BPA-glucuronide et BPA-sulfate sont respectivement, toutes périodes confondues, de 198 ± 42 nM (45.21 ± 9.63 ng/mL), 1918 ± 406 nM (775 ± 164 ng/mL) et 21.43 ± 9.67 nM (6.60 ± 2.98 ng/mL).

Le tableau 6 présente les paramètres toxicocinétiques moyens du BPA obtenus pour ces brebis pour chacune des 4 périodes.

Tableau 6. Paramètres toxicocinétiques moyens du BPA (\pm écart-type, ET) pour quatre stades physiologiques différents après une perfusion IV de BPA à la dose de 2 mg/kg/jour pendant 24h.

	Période 1 (n=6)	Période 2 (n=6)	Période 3 (n=8)	Période 4 (n=4)
Clairance <i>mL/(kg.min)</i>	54.4 ± 12.0	42.9 ± 7.2	55.9 ± 13.9	48.3 ± 4.2
Volume de distribution <i>L/kg</i>	30.4 ± 6.8	24.1 ± 4.1	32.1 ± 7.9	27.2 ± 2.4
Temps de demi-vie <i>h</i>	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.7	0.41 ± 0.2
Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques <i>μM.h</i>	2.8 ± 0.8	3.5 ± 0.5	2.7 ± 0.7	3.0 ± 0.2

La clairance plasmatique moyenne du BPA varie de 42.9 à 55.9 mL/(kg.min) pour les quatre périodes et il n'y a pas d'effet significatif du statut physiologique ($p > 0.05$) sur ce paramètre.

III.1.2. Paramètres toxicocinétiques du BPA-glucuronide aux périodes 3 et 4 (modèle non compartimental : option sparse data)

Le tableau 7 présente les paramètres pharmacocinétiques obtenus pour les deux périodes, 4 mois de gestation et après la mise-bas.

Tableau 7. Paramètres toxicocinétiques moyens aux périodes 3 et 4 après une perfusion IV de BPA-glucuronide à la dose de 3.54 mg/kg/jour pendant 24h.

Paramètres pharmacocinétiques	Période 3 n=6	Période 4 n=8
Clairance (mL/(kg.min))	5.89	5.08
Volume de distribution (L/kg))	3.67	3.24
Temps de demi-vie (h)	3.59	7.26
Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques (µM.h)	24.76	28.72
Concentrations à l'équilibre de BPA-glucuronide (µM)	2.18	1.57

A l'état d'équilibre, les concentrations en BPA-glucuronide sont de l'ordre de 2 µM. La gestation n'a pas modifié l'exposition interne maternelle au BPA-glucuronide.

III.1.3. Effet de la gestation sur la fraction de Bisphénol A libre

La figure 11 illustre le pourcentage de BPA libre dans les échantillons plasmatiques obtenus à l'état d'équilibre pendant une perfusion IV de 24 heures de BPA à la dose de 2 mg/kg/jour en fonction du stade physiologique des brebis.

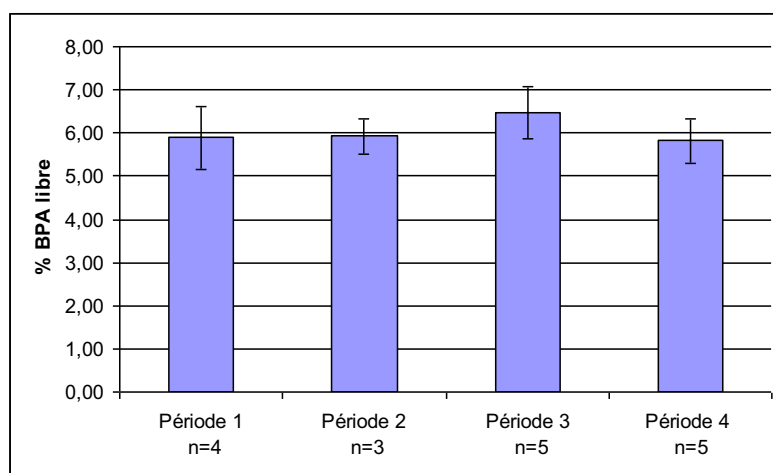


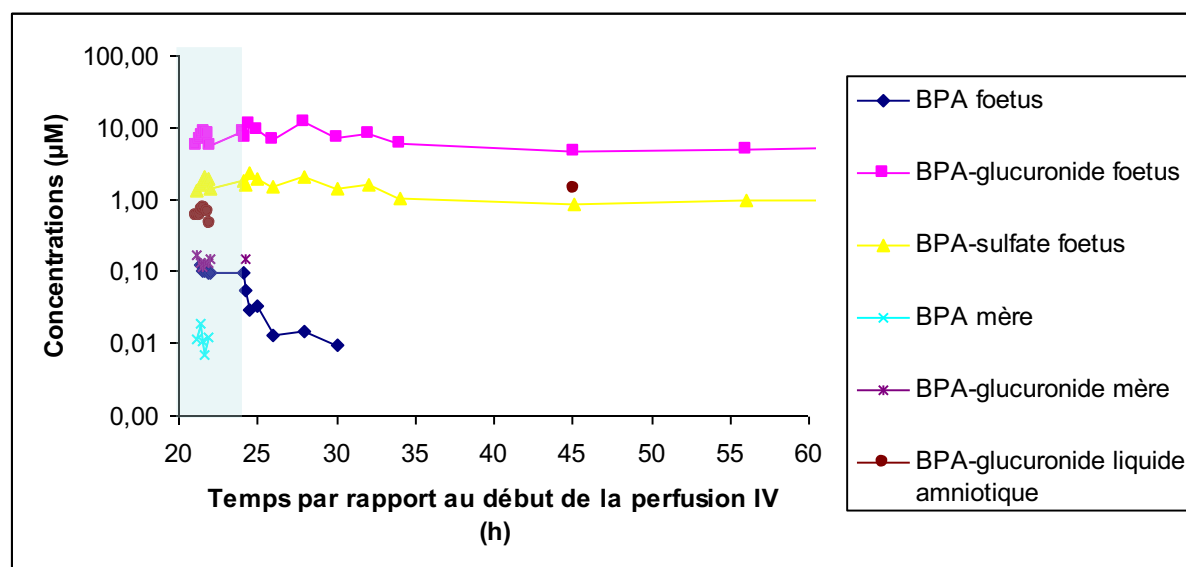
Figure 11. Pourcentage de BPA libre dans le plasma maternel à l'état d'équilibre (moyenne±ET) aux quatre stades physiologiques après une perfusion IV de BPA à la dose de 2 mg/kg/jour pendant 24 h.

Le pourcentage de BPA libre à l'état d'équilibre ne varie pas quelque soit le stade physiologique. Le pourcentage de BPA libre moyen pour l'ensemble des quatre périodes est en moyenne de 6.21±0.7%.

III.2. Toxicocinétique et métabolisme du BPA et du BPA-glucuronide chez le fœtus à 4 mois d'âge conceptionnel

III.2.1. Toxicocinétique du Bisphénol A chez le fœtus

La figure 12 présente le déroulement temporel des concentrations de BPA et de ses métabolites chez la mère et le fœtus après une perfusion IV au fœtus de BPA à la dose de 5mg/kg/jour pendant 24 heures (résultats présentés sur un couple mère-fœtus représentatif de l'ensemble des données obtenues après administration fœtale de BPA).



Légende : Perfusion IV de BPA pendant 24 heures

Avant le lancement de la perfusion, les concentrations du BPA et de ses métabolites étaient inférieures à la limite de détection. Les concentrations de BPA-sulfate chez la mère, et les concentrations du BPA et du BPA-sulfate du liquide amniotique ne sont pas représentées car leurs concentrations sont inférieures à la LOQ.

Figure 12. Concentrations de BPA et de ses métabolites chez un couple mère-fœtus représentatif après une perfusion IV de BPA chez le fœtus à la dose de 5mg/kg/jour pendant 24 heures.

Les concentrations plasmatiques fœtales de BPA deviennent inférieures à la LOQ de 1ng/mL dans les 2 heures qui suivent l'arrêt de la perfusion. La clairance fœtale moyenne (sur 5 fœtus perfusés) du BPA après administration fœtale de BPA est de 250 ± 78 mL/(kg.min), le volume de distribution moyen est de 144 ± 45 L/kg, l'aire sous la courbe (AUC) moyenne est de 1.55 ± 0.44 µM.h et le temps de demi-vie moyen est de 0.89 ± 0.83 h.

L'inspection visuelle de la figure 12 montre également que les concentrations plasmatiques fœtales en métabolites diminuent lentement après l'arrêt de la perfusion et qu'il

existe un certain parallélisme entre les concentrations plasmatiques fœtales de BPA-glucuronide et celles de BPA-sulfate.

Le tableau 8 représente les concentrations moyennes à l'équilibre du BPA et de ses métabolites chez la mère, le fœtus et dans le liquide amniotique après l'administration fœtale de BPA.

Tableau 8. Concentrations moyennes de BPA et de ses métabolites dans le plasma maternel et fœtal et dans le liquide amniotique à l'état d'équilibre après une perfusion IV au fœtus de BPA à la dose de 5mg/kg/jour pendant 24 heures.

	Concentrations moyennes \pm écarts-types (n=5)		
	Fœtus	Mère	Liquide amniotique
BPA (nM)	109.14 \pm 19.84	19.36 \pm 7.06	ND
BPA-glucuronide (μM)	8653 \pm 2492	202 \pm 90	1389 \pm 1075
BPA-sulfate (μM)	369 \pm 124	18.01 (n=1)	ND
Rapport BPA glucuronide/ BPA	78.48 \pm 9.32	11.31 \pm 1.06	

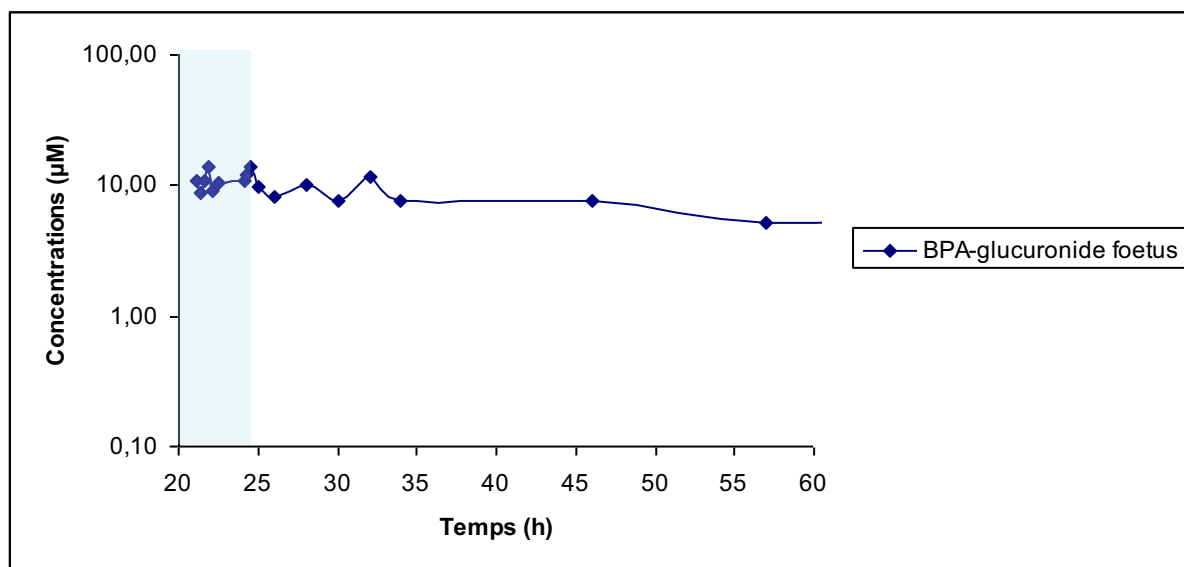
Ce tableau met en évidence un passage du BPA de l'unité fœto-placentaire vers la mère.

Le rapport moyen des concentrations à l'état d'équilibre de BPA entre le fœtus et sa mère est de 6.17 \pm 2.45.

Les pourcentages moyens des concentrations plasmatiques à l'équilibre de BPA, de BPA-glucuronide et de BPA-sulfate par rapport à celles de BPA total chez le fœtus sont respectivement de 1.22 \pm 0.14%, 94.76 \pm 0.35% et 4.02 \pm 0.32%.

III.2.2. Disposition du Bisphénol A et de ses métabolites dans l'unité fœto-maternelle après une administration fœtale de Bisphénol A-glucuronide

La figure 13 montre le décours temporel des concentrations de BPA-glucuronide chez le fœtus après une perfusion IV au fœtus de BPA-glucuronide à la dose de 3.54mg/kg/jour pendant 24 heures (résultats présentés sur un fœtus représentatif de l'ensemble des six fœtus ayant reçu une administration de BPA-glucuronide).



Légende : Perfusion IV de BPA-glucuronide pendant 24 heures

Avant le lancement de la perfusion, les concentrations du BPA et de ses métabolites étaient inférieures à la limite de détection. L'ensemble des concentrations de BPA et de BPA-glucuronide dans le plasma maternel et dans le liquide amniotique, ainsi que les concentrations de BPA dans le sang fœtal sont inférieures la limite de détection de la méthode.

Figure 13. Concentrations plasmatiques de BPA-glucuronide chez un fœtus représentatif après une perfusion IV de BPA-glucuronide à la dose de 3.54mg/kg/jour pendant 24 heures.

Les concentrations plasmatiques fœtales de BPA-glucuronide diminuent lentement après l'arrêt de la perfusion et sont encore supérieures à la LOQ chez le nouveau-né.

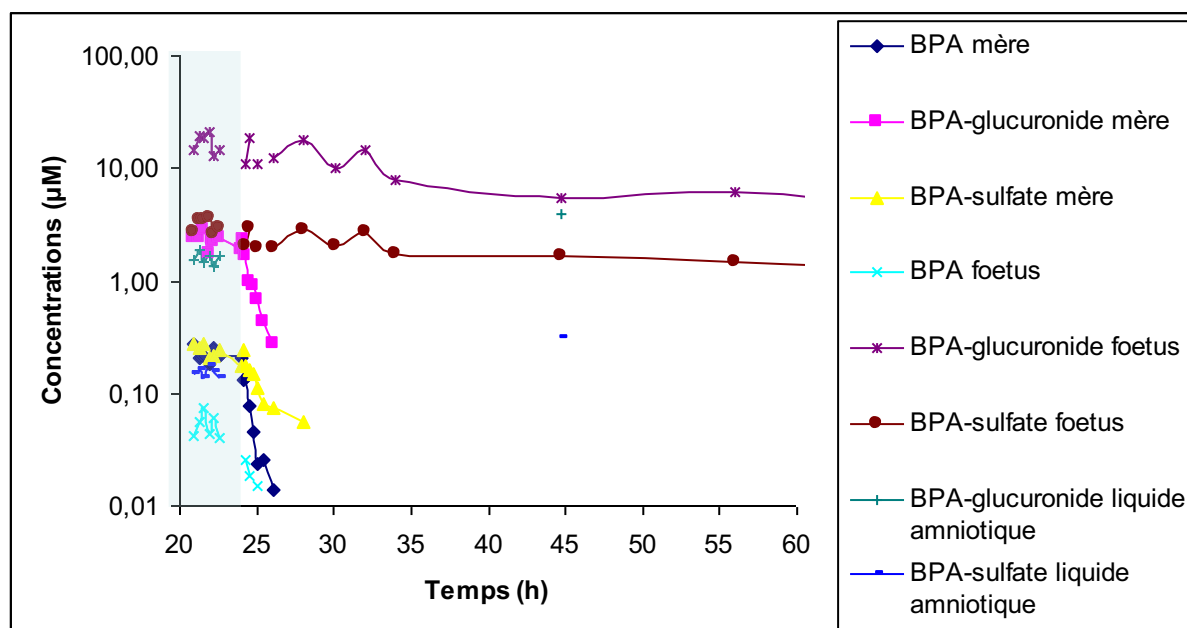
La concentration moyenne à l'équilibre de BPA-glucuronide (évaluée sur 5 administrations fœtales de BPA-glucuronide) dans le sang fœtal est de $10.2 \pm 3.9 \mu\text{M}$.

III.2.3. Fraction de Bisphénol A libre chez le fœtus à 4 mois d'âge gestationnel

Le pourcentage de BPA libre chez 3 fœtus à 4 mois d'âge gestationnel évalué sur un pool de plasma collecté durant la période d'équilibre en fin de perfusion IV de BPA à la dose de 5 mg/(kg.j) est de $10.06 \pm 0.40\%$.

III.2.4. Disposition du Bisphénol A et de ses métabolites dans les compartiments materno-fœtal après une administration maternelle de Bisphénol A

La figure 14 présente le déroulement temporel des concentrations de BPA et de ses métabolites chez la mère et le fœtus après une perfusion IV maternelle de BPA à la dose de 2mg/kg/jour pendant 24 heures (résultats présentés pour un couple mère-fœtus représentatif de l'ensemble des données obtenues après les sept administrations maternelles de BPA).



Légende : [Zone grise shaded] Perfusion IV de BPA

Avant le lancement de la perfusion, les concentrations de BPA étaient sous la limite de détection.

Figure 14. Concentrations du BPA et de ses métabolites chez un couple mère-fœtus après une perfusion IV de BPA chez la mère à la dose de 2mg/kg/jour pendant 24 heures.

Les concentrations plasmatiques maternelles en BPA ont diminué rapidement après l'arrêt de la perfusion avec un temps de demi-vie de 0.76 ± 0.66 h pour atteindre la LOQ de la méthode en moins de 2 heures après l'arrêt de la perfusion.

Les concentrations moyennes à l'état d'équilibre de BPA plasmatique maternelle et fœtale ont été respectivement de 191.91 ± 45.76 µM et de 25.23 ± 12.60 nM. Le rapport moyen des concentrations plasmatiques de BPA entre la mère et le fœtus a été de 7.61 ± 2.39 .

Les concentrations plasmatiques fœtales de BPA-glucuronide et de BPA-sulfate sont élevées et sont restés relativement constantes pendant les 10 heures suivant l'arrêt de la

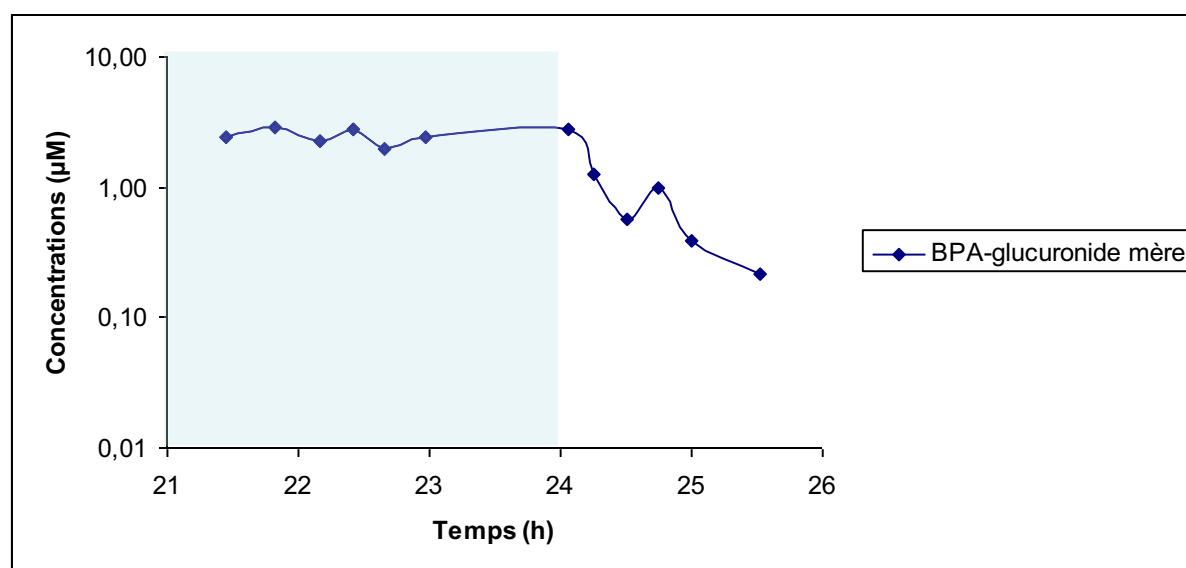
perfusion et décroissent ensuite lentement. Les rapports moyens BPA-glucuronide/BPA sont plus élevés chez le fœtus que chez la mère (respectivement de 231 ± 96 et 9.36 ± 2.77).

Dans le liquide amniotique, le BPA n'a pas été détecté, mais la concentration moyenne en BPA-glucuronide à l'état d'équilibre y est élevée ($1.45 \pm 1.77 \mu\text{M}$) et le reste jusqu'à la naissance.

Après la perfusion maternelle de BPA, les pourcentages des concentrations maternelles de BPA, BPA-glucuronide et BPA-sulfate à l'état d'équilibre sont respectivement de $10.00 \pm 1.82 \%$, $88.62 \pm 1.71 \%$ et $1.37 \pm 0.18 \%$ et de $0.52 \pm 0.29 \%$, $95.17 \pm 2.79 \%$ et $4.31 \pm 2.56 \%$ dans le plasma fœtale.

III.2.5. Disposition du Bisphénol A et de ses métabolites dans l'unité fœto-maternelle après une administration maternelle de Bisphénol A-glucuronide

La figure 15 illustre le décours temporel des concentrations des métabolites du BPA dans les compartiments fœto-maternels après une perfusion IV maternelle de BPA-glucuronide à la dose de 3.54 mg/kg/jour pendant 24 heures (résultats présentés sur un couple mère-fœtus représentatif des sept brebis gravides ayant reçu une perfusion de BPA-glucuronide).



Légende : Perfusion IV de BPA-glucuronide

Figure 15. Concentrations de BPA-glucuronide dans chacun des compartiments du complexe fœto-maternel après une perfusion IV de BPA-glucuronide chez la mère à la dose de 3.54 mg/kg/jour pendant 24 heures.

Après la perfusion maternelle de BPA-glucuronide à la dose de 3.54 mg/(kg.jour), les concentrations plasmatiques maternelles en BPA-glucuronide ont chuté rapidement avec un temps de demi-vie de 3.67 h pour atteindre la LOQ de la méthode en moins de 2 heures après l'arrêt de la perfusion. Le BPA n'a pas été détecté dans le plasma maternel après l'administration maternelle de BPA-glucuronide. Ni le BPA, ni ses métabolites n'ont été détecté dans la plasma fœtal et le liquide amniotique après administration maternelle de BPA-glucuronide.

III.2.6. Clairances non placentaires maternelle et fœtale et des clairances placentaires materno-fœtale et foeto-maternelle

98 % de la clairance totale maternelle (clairance totale maternelle = 2698 mL/min) est non-placentaire. En revanche, 91 % de la clairance totale fœtale (clairance totale fœtale = 514.7 mL/min) est placentaire.

IV. Discussion

La première conclusion de cette étude est que la gestation n'entraîne pas de modification de l'exposition interne maternelle au BPA. Ces données ne soutiennent donc pas l'hypothèse d'une surexposition maternelle au BPA pendant la gestation, suggérée par les études de biomonitoring chez la femme enceinte (*Lee et al, 2008 ; Padmanabhan et al, 2008 ; Schönfelder et al, 2002*).

La clairance plasmatique du BPA n'a pas été modifiée pendant la gestation. Pour chacun des stades physiologiques, la clairance plasmatique est de l'ordre de 40-50 mL/(kg.min). Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue au laboratoire dans une étude précédente : la clairance plasmatique du BPA avait été évaluée à 54.1 ± 24.7 mL/(kg.min) après 1 heure de perfusion de BPA aux doses de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/(kg.jour) (*Collet et al, 2010*). Les valeurs de clairance plasmatique de BPA obtenues dans notre étude sont proches de celle estimée chez l'homme (30 mL/(kg.min)) dans l'étude de Völkel et al (*Völkel et al, 2002*).

La gestation n'a pas modifié les capacités maternelles de glucurono-conjugaison du BPA dans notre modèle. Au contraire, chez le rat, Matsumoto et al ont montré que l'activité UDP-glucuronosyl-transférase vis-à-vis du BPA était diminuée de moitié pendant la gestation (*Matsumoto et al, 2002*).

Nos résultats montrent que la gestation ne modifie pas de façon significative le pourcentage de BPA libre (de l'ordre de 6%). Cette valeur est similaire à celle retrouvée chez l'homme : in vitro, Csanady et al ont en effet estimé le pourcentage de BPA non lié aux protéines plasmatiques à 5-8% (*Csanady et al, 2002*).

Chez la brebis, Kouretas et al ont montré que les concentrations de SHBG à 1 et 3 mois de gestation sont du même ordre de grandeur que celles trouvées chez la brebis non gravide (*Kouretas et al, 1999*), ce qui contribue à expliquer que la part de BPA non liée aux protéines plasmatiques est la même chez les brebis gravides et non gravides dans notre étude.

Cette étude a permis aussi de calculer le pourcentage de BPA transféré de la mère au fœtus après une perfusion maternelle de BPA.

Nos résultats montrent que le BPA peut passer la barrière placentaire de la mère au fœtus et vice versa. La formule ci-dessous (Equation 2) nous permet de déduire le pourcentage de BPA transféré au fœtus après la perfusion maternelle de BPA à la dose de 2mg/kg/jour.

$$Cl_{BPA} = \frac{K_0}{C_{SS_{BPA}}}$$

Equation 2

Où Cl_{BPA} est la clairance fœtale moyenne plasmatique du BPA du fœtus, $C_{SS_{BPA}}$, la concentration moyenne plasmatique fœtale de BPA à l'équilibre après administration maternelle de BPA et K_0 est le taux d'entrée du BPA dans le compartiment fœtal en ng/(kg.min).

Le K_0 théorique obtenu est de 1232 ng/(kg.min), soit 1.8mg/(kg.jour). En considérant que le poids de la mère et du fœtus sont respectivement de 60kg et 2.5kg, nous en déduisons que 3.8% de la dose administrée à la mère a été transférée au fœtus. La dose reçue par le fœtus, 1.8 mg/(kg.jour), est proche de la dose reçue par la mère de 2 mg/(kg.jour) si on les rapporte aux poids respectifs. Après une perfusion maternelle de BPA, le fœtus est donc exposé au BPA de façon similaire à sa mère.

Le calcul des clairances placentaires et non placentaires maternelles et fœtales du BPA donne des précisions sur les modalités d'exposition du fœtus.

98% du BPA administré à la mère est éliminé sans passage via le placenta. Ce résultat est en accord non seulement avec la valeur élevée de la clairance plasmatique maternelle (40-50 mL/(kg.min)), qui est du même ordre de grandeur que le débit sanguin hépatique chez de nombreuses espèces domestiques, mais aussi avec le fait qu'il n'y a pas d'effet stade physiologique sur la valeur de la clairance maternelle du BPA. La faible part placentaire de la clairance maternelle du BPA (2% de la clairance totale maternelle) est en accord avec le taux calculé de BPA transféré au fœtus (3.8%).

Contrairement à la mère, la clairance placentaire fœtale correspond à quasiment la totalité de la clairance totale fœtale (91% de la clairance totale).

Les propriétés physico-chimiques du BPA ($\log K_{ow} = 3.32$ et $M = 228\text{g/mol}$) lui permettent de traverser le placenta par diffusion passive dans les sens materno-fœtal et fœto-maternel. Cependant, la clairance placentaire fœto-maternelle est 11 fois plus élevée que la clairance materno-fœtale. Différentes raisons peuvent l'expliquer. Le BPA est un substrat de la pompe glycoprotéine P à efflux (Jin et al, 2005). Cette pompe à efflux protège le fœtus contre les xénobiotiques toxiques (Ceckova-Novotna et al, 2006), ce qui réduirait le passage

placentaire du BPA de la mère au fœtus. D'autre part, la clairance placentaire materno-foetale est peut-être sous-estimée car une partie du BPA transférée au fœtus via le placenta subit un métabolisme de premier passage hépatique, à l'instar de ce qui a été démontré pour la diphenhydramine (*Kumar et al, 1997*). En effet, le BPA administré à la mère rejoint la circulation fœtale via la veine ombilicale et environ 50% du flux de cette veine passe par le foie fœtal avant de rejoindre la circulation générale du fœtus.

La placentation est de type syndesmochorial chez l'ovin et hémochorial chez l'homme. Cette différence histologique suggère que le transfert materno-fœtal de BPA pourrait être supérieur à 3.8% (valeur obtenue dans notre étude) chez l'homme. Dans un modèle ex vivo de perfusion de BPA (10 ng/mL pendant 180 min) de placentas humains, à terme, isolés, 27% du BPA du compartiment maternel est transféré dans la circulation fœtale (*Balakrishnan et al, 2010*).

Le BPA-glucuronide est une molécule hydrophile qui peut difficilement traverser la barrière placentaire. Après une administration maternelle de BPA-glucuronide, les concentrations plasmatiques fœtales de BPA-glucuronide sont restées inférieures à la LOQ. Ces données montrent que le BPA-glucuronide ne passe pas ou très faiblement la barrière placentaire. Cette conclusion est donc cohérente avec l'étude de Nishikawa et al, chez la rate gravide, pour laquelle seulement 0.13% de la dose de BPA-glucuronide administrée à la mère était transférée au fœtus (*Nishikawa et al, 2004*).

De la même façon, après l'administration fœtale de BPA-glucuronide, nous n'avons pas mis en évidence de passage transplacentaire fœto-maternel du BPA-glucuronide.

Les paramètres toxicocinétiques du BPA-glucuronide n'ont pas pu être déterminés chez le fœtus car les métabolites du BPA sont éliminés dans le liquide amniotique et le fœtus les réabsorbe en permanence en ingérant son liquide amniotique. Ainsi, la réabsorption du liquide amniotique par le fœtus (300 mL par jour) peut être considérée comme une administration orale répétée de BPA-glucuronide.

Notre travail permet aussi de comparer le métabolisme fœtal et maternel du BPA. Il semble que, chez la mère et le fœtus, la déconjugaison du BPA-glucuronide ou du BPA-

sulfate soit un phénomène plus limité que la conjugaison. Nishikawa et *al* ont mis en évidence une faible déconjugaison du BPA-glucuronide (4%) dans l'unité fœto-placentaire de rat (*Nishikawa et al, 2004*). Nos expérimentations ne permettent pas de savoir si le fœtus ovin est capable d'hydrolyser le BPA à des stades de gestation moins avancés que 4 mois.

Dans notre modèle, le calcul des rapports entre les concentrations maternelles en métabolites (BPA-glucuronide ou BPA-sulfate) et les concentrations fœtales en métabolites montre que le taux de BPA-glucuronide ou de BPA-sulfate est plus important dans le compartiment fœtal que dans le compartiment maternel après une administration maternelle de BPA. Au contraire, chez le rat, Domoradzki et *al* ont montré que, suite à une administration orale de BPA (10mg/kg) à 16 jours de gestation, le BPA et son métabolite principal sont retrouvés chez le fœtus à des concentrations respectivement 3.6 fois et 131 fois plus faibles que les concentrations plasmatiques maternelles (*Domoradzki et al, 2003*).

Nous n'avons pas observé de passage transplacentaire du BPA-glucuronide du sang maternel vers le sang fœtal. Les concentrations élevées de BPA-glucuronide dans le sang fœtal sont donc expliquées par une forte capacité de l'unité fœto-placentaire à glucuronocjuguer le BPA. Ce résultat n'est pas en accord avec l'étude de Pretheeban et *al* (étude réalisée sur 3 fœtus ovins), dans laquelle il conclut que l'UGT n'est que faiblement exprimée chez le fœtus ovin à 120 mois d'âge conceptionnel (*Pretheeban et al, 2011*). Cependant, cette étude est fondée sur la mesure de l'expression de l'UGT dans le foie fœtal et ne prend donc pas en compte l'activité UGT placentaire. Dans notre étude, suite à l'administration maternelle de BPA, les concentrations en BPA-glucuronide étaient environ 3 fois plus élevées chez le fœtus et les concentrations en BPA environ 12 fois plus faibles chez le fœtus que chez la mère. Chez l'homme, les isoformes d'UGT ne sont pas exprimées avant 20 semaines de gestation, ce qui suggère que, en début de gestation, le fœtus humain n'est pas capable de transformer le BPA en sa forme conjuguée, inactive (*Strassburg et al, 2002*), ce qui pourrait le rendre plus vulnérable aux effets néfastes du BPA en début de gestation.

Le pourcentage de BPA-sulfate par rapport au BPA total est de l'ordre de 4 % chez le fœtus après administration fœtale de BPA et de l'ordre de 1 % chez la mère après administration maternelle de BPA. La sulfoconjugaison n'apparaît donc pas comme une voie de métabolisation du BPA plus importante chez le fœtus que chez l'adulte.

Le pourcentage de BPA non lié aux protéines plasmatiques chez le fœtus est environ deux fois plus élevé que chez les mères. Chez le mouton, les concentrations plasmatiques d'albumine sont respectivement de 21 mg/mL et de 39 mg/mL chez le fœtus à 125 jours d'âge gestationnel et chez l'adulte (*Dziegielewska et al, 1980*). La plus faible concentration plasmatique en albumine chez le fœtus pourrait expliquer que la fraction de BPA libre soit plus importante chez le fœtus que chez l'adulte.

Conclusion

L'objectif de ce travail était de caractériser l'exposition interne maternelle et fœtale au BPA et au BPA-glucuronide dans un modèle intégratif ovin fondé sur des considérations physiologiques.

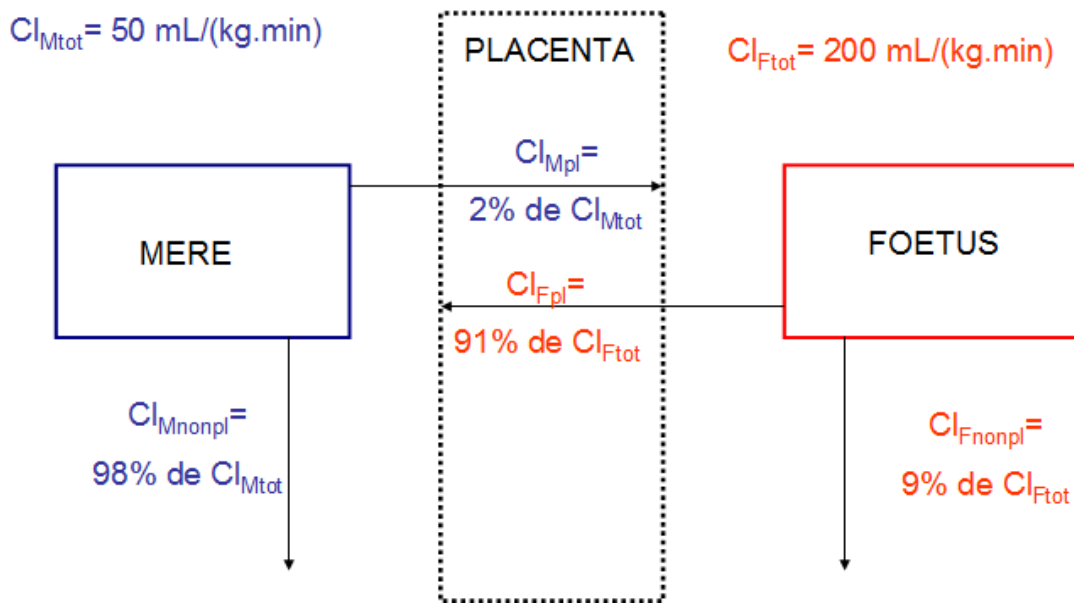
Nous n'avons pas mis en évidence d'effet significatif de la gestation sur la toxicocinétique du BPA.

Nos expérimentations ont aussi permis d'évaluer le métabolisme du BPA chez le fœtus à 4 mois d'âge conceptionnel. Nos résultats montrent que le fœtus est capable de glucurono-conjuguer le BPA et que la sulfoconjugaison est une voie de métabolisation plus importante que chez l'adulte. Nous n'avons pas mis en évidence d'hydrolyse des métabolites par l'unité fœto-placentaire.

L'évaluation des passages transplacentaires permet de conclure qu'après une administration IV maternelle de BPA, le fœtus est exposé au BPA de manière similaire à l'exposition externe maternelle. 3.8 % de la dose administrée à la mère est transférée au fœtus. Ainsi, le fœtus reçoit plus de la moitié de la dose administrée à la mère, quand la dose est rapportée aux poids respectifs.

Le transfert placentaire (figure 16) et le métabolisme de l'unité fœto-placentaire ont été identifiés comme les déterminants majeurs de l'exposition fœtale au BPA. Pour extrapoler ces données à l'homme, une approche modélisatrice qui intègre les spécificités du métabolisme et du transport via le placenta chez l'homme pourrait être développée.

Légende : $Cl_{Mt\text{tot}}$: Clairance maternelle totale, $Cl_{M\text{nonpl}}$: Clairance maternelle non placentaire,



Cl_{Mpl} : Clairance maternelle placentaire ; $Cl_{F\text{tot}}$: Clairance fœtale totale, $Cl_{F\text{nonpl}}$: Clairance fœtale non-placentaire, Cl_{Fpl} : Clairance placentaire fœtale.

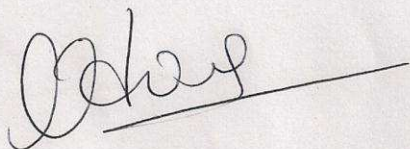
98 % de la clairance maternelle totale est non placentaire et 2 % est placentaire, contrairement au fœtus où, 91% de la clairance totale est placentaire et 9 % non placentaire

Figure 15. Description des clairances maternelle, fœtale et placentaires chez la brebis à 4 mois de gestation.


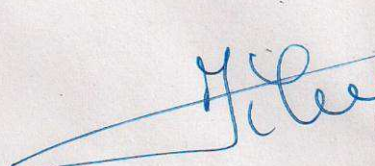
AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, **Nicole HAGEN**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Rémi MEREUX** intitulée « *Caractérisation de l'exposition fœtale et maternelle au bisphénol A et au bisphénol A glucuronide dans un modèle ovin fondé sur des considérations physiologiques* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

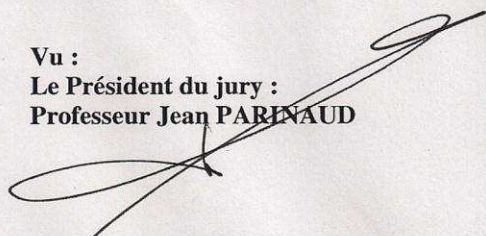


Fait à Toulouse, le 11 Mai 2012
Professeur Nicole HAGEN
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

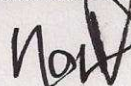


Vu :
**Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse**
Professeur Alain MILON

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jean PARINAUD



Vu et autorisation de l'impression :
**Le Président de l'Université
Paul Sabatier**
Professeur Bertrand MONTAUDO



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Bibliographie

1. **Adamo C, Antignac JP, Auger J et al.** Bisphénol A : Effet sur la reproduction, rapport préliminaire. INSERM, 2010.
2. **Aguilar F, Autrup H, Barlow S et al.** Toxicokinetics of Bisphenol A: Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing, aids and Materials in Contact with Food (AFC), European Food safety Authority (EFSA), 2008.
3. **ANSES.** Effets sanitaires du Bisphénol A: Rapport d'expertise collective & Connaissances relatives aux usages du bisphénol A : Rapport d'étude, septembre 2011.
4. **Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, Ponnampalam AP et al.** Transfer of Bisphenol A across the human placenta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **202**, p 393-395, 2010.
5. **Barry JS, Anthony RV.** The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology*, **69** (1), p 55-67, 2008.
6. **Bazer FW, Spencer TE, Thatcher WW.** Growth and development of the ovine conceptus. *Journal of animal science*, **90** (1), p 159-170, 2012
7. www.bisphenol-a-europe.org page consultée le 19/10/2011.
8. <http://www.bisphenol-a.org/about/bpa-info/bpa-synthesis.html> page consultée le 19/10/2011 page consultée le 19/10/2011.
9. **Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS et al.** Perinatal Exposure to Environmentally Relevant Levels of Bisphenol A Decreases Fertility and Fecundity in CD-1 Mice. *Environmental Health Perspectives*, **119** (4), p 547-552, 2011.
10. **Calafat MA, Kuklenyik Z, Reidy JA et al.** Urinary concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a human reference population. *Environmental health perspectives*, **113** (4), p 391-395, 2005.
11. **Carlsen E, Giwercman A, Keiding N et al.** Evidence for the decreasing quality of semen during the past 50 years. *British Medical Journal*, **305**, p 609–612, 1992.
12. **Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F.** P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reproductive Toxicology*, **22**(3): p 400-410, 2006.
13. **Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP.** Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology*, **185**, p 119-127, 2003.
14. **Collet SH, Picard-Hagen N, Viguié C et al.** Estrogenicity of Bisphenol A: a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb. *Toxicological Sciences*, **117** (1), p 54-62, 2010.
15. **Collier AC, Miyagi SJ, Yamauchi Y et al.** Assisted reproduction technologies impair placental steroid metabolism. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **116** (1-2), p 21-28, 2009.
16. **Csanady GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B et al.** Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Archives of Toxicology*, **76** (5-6), p 299-305, 2002.
17. **Déchaud H, Ravard C, Claustrat F et al.** Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (SHBG). *Steroids*, **64** (5), p 328-334, 1999.

18. **Domoradzki JY, Pottenger LH, Thornton CM et al.** Metabolism and pharmacokinetics of Bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-monoglucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages. *Toxicological Sciences*, **76**, p 21-34, 2003.
19. **Dodds EC, Lawson W.** Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*, **137**, p 996, 1936.
20. **Dziegielewska KM, Evans CAN, Fossan G et al.** Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal sheep during development. *Journal of Physiology*, **300**, p 441-455, 1980.
21. **EFSA**, Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments [AFC] relative au 2,2-bis-(4-hydroxyphényl)-propane (Bisphénol A), 2007.
22. **Erler C, Novak J.** Bisphenol A exposure: Human risk and Health policy. *Journal of pediatric nursing*, **25**, p 400-407, 2010.
23. **Fernandez SV, Russo J.** Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicologic Pathology*, **38** (1), p 110-122, 2010.
24. **Galloway T, Cipelli R, Guralnik J and al.** Daily Bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. *Environmental Health Perspectives*, **118** (11), p 1603-1608, 2010.
25. **Hanaoka T, Kawamura N, Hara K et al.** Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to Bisphenol diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occupational and Environmental Medicine*, **59**, p 625-628, 2002.
26. **Ho SM, Tang WY, Belmonte J et al.** Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research*, **66**, p 5624-5632, 2006.
27. **Honma S, Suzuki A, Buchanan DL et al.** Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive Toxicology*, **16**, p 117-122, 2002.
28. **Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA et al.** Exposure to Bisphenol A advances puberty. *Nature*, **401**, p 763-764, 1999.
29. **Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y and al.** Determination of Bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*, **17** (11), p 2839-2841, 2002.
30. **Jin H, Audus KL.** Effect of bisphenol A on drug efflux in BeWo, a human trophoblast-like cell line. *Placenta*, **26**, suppl. S96-S103, 2005.
31. **Kang JH, Katayama Y, Kondo F.** Biodegradation or metabolism of Bisphenol A: from microorganisms to mammals. *Toxicology*, **217**, p 81-90, 2006.
32. **Kang JH, Kondo F, Katayama Y.** Human exposure to Bisphenol A. *Toxicology*, **226**, p 79-89, 2006.
33. **Kouretas D, Laliotis V, Taitzoglou I et al.** Sex-hormone binding globulin from sheep serum: purification and effects of pregnancy and treatment with exogenous estradiol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **123**, p 233-239, 1999.
34. **Kumar S, Tonn GR, Riggs KW et al.** Diphenhydramine disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: determinants of plasma drug concentrations in the mother and the fetus. *European Journal of Pharmaleucical Sciences*. **88** (12), p 1259-1265, 1999.
35. **Lacroix MZ, Puel S, Collet SH et al.** Simultaneous quantification of Bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: Applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta*, **85**, p 2053-2059, 2011.

36. **Lee YJ, Ryu HY, Kim Hk et al.** Maternal and fetal exposure to Bisphenol A in Korea. *Reproductive Toxicology*, **25**, p 413-419, 2008.
37. **Li D, Zhou Z, Qing D and al.** Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Human Reproduction*, **0**, p 1-9, 2009.
38. **Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A.** Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, **110** (2), p 193-196, 2002.
39. **Matthews JB, Twomey K, Zakarewski TR.** In vitro and in vivo interactions of Bisphenol A and its metabolite, Bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β . *Chemical research in Toxicology*, **14** (2), p 149-157, 2001.
40. **Mendiola J, Jorgensen N, Andersson AM and al.** Are environmental levels of Bisphenol A associated with reproductive function in fertile men? *Environmental Health Perspectives*, **118** (9), p 1286-1292, 2010.
41. **Mielke H, Gundert-Remy U.** Bisphenol A levels depend on age and exposure. *Toxicology letters*, **190** (1), p 32-40, 2009.
42. **Muñoz de Toro, Markey CM, Wadia PR et al.** Perinatal exposure to Bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*, **146**, p 4138-4147, 2005.
43. **Nagel SC, Vom Saal FS, Thayer KA et al.** Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens Bisphenol A and Octylphenol. *Environmental Health Perspectives*, **105**, p 70-76, 1997.
44. **Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R et al.** Placental transfer of conjugated Bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environmental Health Perspectives*, **118** (9), p 1196-1203, 2010.
45. **Olsen CM, Meussen-Elholm ETM, Samuelson M and al.** Effects of the environmental estrogen Bisphenol A, Tetrachlorobisphenol A, Tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on estrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of estrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacology and Toxicology*, **92**, p 180-188, 2003.
46. **Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S et al.** Maternal Bisphenol A levels at delivery: a looming problem? *Journal of Perinatology*, **28**, p 258-263, 2008.
47. **Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA et al.** The relative bioavailability and metabolism of Bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological Sciences*, **54**, p 3-18, 2000.
48. **Pretheeban M, Hammond G, Bandiera S et al.** Ontogenesis of UDP-glucuronosyltransferase enzymes in sheep. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **159** (2), p 159-166, 2011.
49. **Rubin BS, Soto AM.** Bisphenol A: perinatal exposure and body weight. *Molecular and cellular Endocrinology*, **304**, p 55-62, 2009.
50. **Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H and al.** Parent Bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives*, **110** (11), p A703-A707, 2002.
51. **Singleton DW, Feng Y, Yang J et al.** Gene expression profiling reveals novel regulation by bisphenol A in estrogen receptor- α -positive human cells. *Environmental Research*, **100** (1), p 86-92, 2006.
52. **Strassburg CP, Strassburg A, Kneip S et al.** Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. *Gut*, **50**, p 269-265, 2002.

53. **Szeto HH.** Pharmacokinetics in the ovine maternal-fetal unit. *Annual review pharmacology and toxicology*, **22**, p 221-243, 1982.
54. **Takahashi O, Oishi S.** Disposition of orally administered 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environmental Health Perspectives*, **108** (10), p 931-935, 2000.
55. **Takeuchi T, Tsutsumi O.** Bisphenol A serum concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **291**, p 76-78, 2002.
56. **Tyl RW, Myers CB, Marr MC et al.** Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, **68** (1), p 121-146, 2002.
57. **Uriel J, Dupiers M, Rimbaut C and al.** Maternal serum levels of sex steroid binding protein during pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynecology*, **88** (12), p 1229-1232, 1981.
58. **Vandenberg HL, Hauser R, Marcus M et al.** Human exposure to Bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, **24**, p 139-177, 2007.
59. **Völkel W, Colnot T, Csanady GA et al.** Metabolism and kinetics of Bisphenol A in humans at low doses oral administration. *Chemical Researches in Toxicology*, **15**, p 1281-1287, 2002.
60. **Vom Saal S, Akingbemi BT, Belcher SM et al.** Chapel Hill Bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive Toxicology*, **24**(2), p 131-138, 2007.
61. **Vom Saal S, Hughes C.** An extensive new literature concerning low-dose effects of Bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental health perspectives*, **113** (8), p 926-933, 2005.
62. **Wheterill YB, Benson TA, Kanno J et al.** In vitro molecular of Bisphenol A mechanism action. *Reproductive Toxicology*, **24**, p 178-198, 2007.
63. **Ye X, Kuklenyik Z, Needham LL et al.** Quantification of urinary conjugates of Bisphenol A, 2,5-Dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, **383** (4), p 638-644, 2005.
64. **Zalko D.** BPA : où en est-on? *Conférence*, 29 novembre 2010.
65. **Zalko D, Jacques C, Duplan H et al.** Viable skin efficiently absorbs and metabolizes Bisphenol A. *Chemosphere*, **82**, p 424-430, 2011.

Annexe

Répartition des 25 brebis sur les 4 périodes (P1 : 1 mois avant la mise à la reproduction, P2 : 1 mois de gestation, P3 : 4 mois de gestation, P4 : après la mise-bas) et séquence d'administration pour les périodes 3 et 4

Lettre	Identification n	Numéro	Reproduction			Période										
			IA	Retour (saillie bêlier)	Nombre de fœtus	P1	P2	P3			P4					
A	1035	B4	X		1	X	X	Maternelle	BPA	BPA-glucuronide	Séquence A	Séquence B	Séquence A	Séquence B	BPA-glucuronide	BPA-glucuronide
B	1069	B15	X		1	X	X	Maternelle	BPA-glucuronide	BPA			BPA-glucuronide	BPA		BPA
C	1129	B18	X		3	X	X	Maternelle	BPA-glucuronide	BPA			BPA-glucuronide	BPA		BPA
D	884	B1	X		2	X	X	Maternelle	BPA-glucuronide	BPA (incomplète)						
E	792	B14	X		2	X	X	Maternelle	BPA (contrôle)							
F	1042	B17	X		2	X	X	Maternelle	BPA-glucuronide	BPA			BPA-glucuronide	BPA		BPA
G	1017	B2		X	1	X		Maternelle	BPA	BPA-glucuronide			BPA-glucuronide	BPA	BPA-glucuronide	
H	961	B6		X	1	X		Maternelle	BPA-glucuronide	BPA						
V	922	B9		X	1	X	X	Fœtale	BPA	BPA-glucuronide			BPA-glucuronide			
W	883	B5		X	1	X		Fœtale	BPA-glucuronide	BPA						
X	815	B25	X		1			Fœtale	BPA	BPA-glucuronide						
Y	907	B23	X		3			Fœtale	BPA-glucuronide	BPA						
Z	979	B22	X		2			Fœtale	BPA (équilibre)							
T	869	B24		X	1			Fœtale	BPA	BPA-glucuronide						
S	739	B7		X	2	X	X	Fœtale	BPA-glucuronide	BPA						
U	889	B13		X	3	X	X	Fœtale	BPA-glucuronide	BPA						
R	971	B10		X	2	X	X	Fœtale	BPA	BPA glucuronide						
I	1141	B11		X	2	X	X	Maternelle	BPA-glucuronide	BPA			BPA-glucuronide	BPA		BPA
J	965	B19		X	2	X	X	Maternelle	BPA	BPA-glucuronide			BPA	BPA-glucuronide	BPA-glucuronide	
K	1126	B20		X	2	X	X	Maternelle	BPA	BPA-glucuronide			BPA-glucuronide	BPA		BPA
/	1054	B12	X		1	X	X									
/	886	B3	X		2	X	X									
/	956	B8	X		2	X	X									
/	1119	B16	X		2	X	X									
O	1135	B21		X	2			Maternelle	BPA	BPA-glucuronide			BPA	BPA-glucuronide	BPA-glucuronide	
Effectif			N=13	N=12	N(1)=9 N(2)=13 N(3)=3	N=20	N=15	N(Maternelle)=12 N(Fœtale)=9	N(Maternelle)=11 N(Fœtale)=8	N(Maternelle)=10 N(Fœtale)=6	N=10	N=10		N=10		

Toulouse, 2012

NOM : MEREAX

PRENOM : Rémi

TITRE : CARACTERISATION DE L'EXPOSITION FŒTALE ET MATERNELLE AU BISPHENOL A ET AU BISPHENOL A-GLUCURONIDE DANS UN MODELE OVIN FONDE SUR DES CONSIDERATIONS PHYSIOLOGIQUES

RESUME : Le Bisphénol A (BPA), est un contaminant alimentaire issu de la plasturgie aux propriétés oestrogénomimétiques. Notre hypothèse est que les particularités métaboliques de l'unité materno-foeto-placentaire pourraient entraîner une surexposition du fœtus au BPA. Pour répondre à la question du risque lié à une exposition chronique à de faibles doses de BPA chez l'Homme, nous avons développé une approche intégrative sur un modèle ovin permettant d'évaluer, l'exposition interne, les paramètres toxicocinétiques du BPA et de son principale métabolite, le BPA-glucuronide (BPA-G) et de caractériser le transfert transplacentaire du BPA.

La gestation n'a pas modifié l'exposition interne maternelle au BPA et au BPA-G. Le transfert materno-fœtal a été évalué à 4% de la dose administrée à la mère. L'unité fœto-placentaire est capable de métaboliser le BPA en ses métabolites, qui s'accumulent dans le compartiment fœtal.

MOTS-CLES : BISPHENOL A, BPA-GLUCURONIDE, COMPLEXE FOETO-MATERNEL, PARAMETRES TOXICOCINETIQUES, OVIN, FOETUS

ENGLISH TITLE : CHARACTERIZATION OF MATERNAL AND FETAL BISPHENOL A AND BISPHENOL A GLUCURONIDE EXPOSURE IN A PHYSIOLOGICALLY-BASED SHEEP MODEL

ABSTRACT : Bisphenol A (BPA), an estrogenic compound, is a food contaminant stemming from the plastic industry. Our hypothesis is that distinctive features of the metabolism of the materno-fetal-placental unit could lead to an overexposure of the fetus to BPA. To answer the question about the risk linked to human chronic exposure to low doses of BPA, we have developed an integrative approach based on an ovine model, which enables us to evaluate the internal exposure as well as BPA and its main metabolite, the BPA-glucuronide (BPA-G), toxicokinetic parameters and to describe BPA transplacental transfer.

Gestation did not modify the internal maternal exposure to BPA and BPA-glucuronide. Materno-fetal transfer was about 4% of the dose given to the mother. Feto-placental unit is able to transform BPA into its metabolites, which accumulate in fetal compartment.

KEYWORDS: BISPHENOL A, BPA-GLUCURONIDE, FETO-MATERNAL UNITY, TOXICOKINETIC PARAMETERS, OVINE, FETUS